

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

## MÉCANISME DE FORMATION DES FORMES FILTRABLES ET INVISIBLES

par PAUL HAUDUROY (\*).

(*Institut d'Hygiène et de Bactériologie, Lausanne.*)

En 1924 [1], j'ai signalé pour la première fois l'existence de formes submicroscopiques des bactéries et je terminais ma note en écrivant : « Sous l'influence du bactériophage, des microbes tels que les bacilles dysentériques et ceux du groupe Eberth-Coli prennent des formes assez petites pour pouvoir traverser les filtres de porcelaine. »

Dans une série de notes et de mémoires parus entre 1924 et 1936, j'ai montré, soit seul, soit avec divers collaborateurs, la généralité du phénomène découvert, les techniques permettant de cultiver ces formes filtrables et invisibles et la possibilité de reconstituer à partir d'elles la bactérie dont elles étaient issues. J'ai insisté sur leur présence dans le matériel pathologique provenant d'infections à *Salmonella* et sur leur rôle possible dans l'étiologie de ces maladies. J'ai d'ailleurs rappelé tous ces faits en 1949 [2].

Depuis 1924, nos connaissances sur le mécanisme de la lyse bactériophagique ont fait des progrès considérables, grâce surtout au microscope électronique. Nous savons à peu près comment le phage vient se fixer sur la bactérie, comment il la pénètre, comment celle-ci « éclate » en fragments de tailles diverses.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 janvier 1951.

Nous avons appris aussi, depuis, l'existence de « masses nucléaires » dans les corps bactériens. Nous savons enfin que ces « masses » sont les dernières et les plus difficilement attaquées par le bactériophage.

A la lueur de ces connaissances nouvelles il me semble qu'on peut fort bien se représenter le mécanisme probable de formation des formes filtrables et invisibles des bactéries (FFI).

Reprenons avec quelques détails les techniques que j'ai publiées permettant d'obtenir ces formes et de reconstituer à partir d'elles la bactérie dont elles sont issues.

1° On prend :

a) Une bactérie sensible à l'action du bactériophage ;

b) Un bactériophage capable de la lyser. *Ce phage doit posséder autant que possible une activité lytique médiocre.* On ajoute le bactériophage en proportions convenables à la culture et on porte à l'étuve.

2° On suit d'heure en heure le phénomène. La culture, trouble au début, s'éclaircit peu à peu. Après un temps variable avec chaque expérience, on constate que le tube de culture est « presque clair », mais qu'il ne l'est pas complètement. Il est « opalescent », il ressemble à un tube de bouillon « auquel on aurait ajouté quelques gouttes de liquide d'ascite », ai-je écrit à de multiples reprises.

L'opalescence est légère, fine, « délicate » ; le tube ne contient aucun trouble vrai ; on ne constate pas la présence d'ondes moirées pour les bactéries qui en donnent, et la comparaison de tels tubes avec un tube de bouillon non ensemencé, leur observation sous différentes incidences de lumière permettent facilement leur reconnaissance.

3° Arrivé à ce stade de la lyse (il ne faut opérer ni plus tôt, ni plus tard, et c'est là la condition essentielle de réussite), on filtre le tube sur bougie Chamberland L3 par exemple. Le filtrat obtenu doit être parfaitement limpide. On en place une partie à 37° pour dépister toute faute au cours des manipulations. Si, en vingt-quatre, quarante-huit heures, ce filtrat se trouble, il y a eu souillure et toute l'expérience est à refaire. Ce que nous savons à l'heure actuelle de la lyse bactériophagique, les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons opéré nous permettent de supposer avec un grand pourcentage de certitude qu'il existe dans le filtrat deux éléments : le bactériophage et des « fragments » bactériens.

Aucune discussion sur la présence du bactériophage : le moindre contrôle le prouve.

La présence de « fragments bactériens » n'est guère discutable non plus étant donné que la filtration a été faite avant la lyse totale, au moment même où le microscope électronique nous



montre justement « l'éclatement » de la bactérie. La preuve expérimentale formelle de l'existence de ces fragments va d'ailleurs être apportée par la suite de l'expérience. On pourrait objecter que le milieu de culture était « opalescent » *avant* filtration, qu'il était clair *après*. Il est facile de répondre que de très nombreuses bactéries non encore lysées ont été probablement retenues par le filtre ainsi que de nombreux « éclats » bactériens. Un petit nombre d'entre eux a traversé le filtre, nombre qui doit se chiffrer par centaines de mille ou par millions et qui n'est petit que par rapport au nombre total de ces éclats au moment où ils se sont formés.

4° Le filtrat obtenu contient donc, en principe, à côté du bactériophage, ce que j'ai appelé les « formes filtrables et invisibles » (FFI). Il s'agit maintenant de le prouver. Deux techniques permettent d'apporter cette preuve. La première consisterait à voir ces éléments au microscope électronique, puisqu'ils sont invisibles au microscope ordinaire et que, traversant les mêmes filtres, ils ont probablement des dimensions voisines de celles des phages. Jusqu'à maintenant, ceci m'a été impossible. Mais les essais poursuivis dans ce sens n'ont été que fragmentaires, isolés, et sont en réalité sans valeur.

La seconde technique consiste à « reconstituer » la bactérie à partir des filtrats obtenus dans les conditions décrites précédemment. Cette technique est facile et peut être réalisée pour chaque expérience.

5° Deux procédés peuvent être employés. Le premier, le plus mauvais, consiste à placer à l'étuve à 37° le tube de filtrat dont on s'est assuré au préalable qu'il n'a pas été souillé au cours des manipulations et à l'y laisser séjourner. Après des délais extrêmement variables, quelques dizaines de jours, quelques mois, parfois plus d'une année, on verra, *quelquefois mais pas toujours*, le tube se troubler et l'examen microscopique montrera la présence de la bactérie avec laquelle l'expérience avait été initialement faite. La lenteur de ce procédé, l'impossibilité pratique de suivre l'évolution des éléments qui y apparaissent le rendent aussi peu pratique et démonstratif que possible.

Le second procédé consiste à ensemercer quelques gouttes du filtrat obtenu, *parfaitement limpide*, au centre d'une boîte de Petri contenant de la gélose lactosée tournesolée. Cette boîte est portée à l'étuve à 37° sans être retournée. Vingt-quatre à quarante-huit heures après on constate l'apparition d'une culture d'aspect spécial à l'endroit où l'on a fait l'ensemencement. Cette culture est difficile à dépister au premier abord. Il ne s'agit nullement de « colonies » même microscopiques telles que nous sommes habitués à les voir. Il s'agit de quelque chose de tout à fait inhabituel, d'anormal : *d'un simple dépoli à l'endroit précis où l'on a déposé les gouttes de filtrat*. Le brillant de la surface de la

gélose lactosée tournesolée, le miroir qu'elle constitue, dans lequel on pourrait faire refléter des objets, est terni comme par une buée, d'autant plus visible qu'elle est limitée.

Pour reconnaître ces cultures d'aspect spécial, il faut y apporter beaucoup d'attention et utiliser une lumière incidente. Il semble qu'elles aient échappé bien souvent à des expérimentateurs qui, ne les apercevant pas, ont nié du même coup leur existence. Avec un fil de platine, on « racle » alors cette « culture » et on émulsionne le produit de raclage dans 1 à 2 cm<sup>3</sup> de bouillon ordinaire. On arrache presque fatalement des fragments de gélose au cours de ce prélèvement, ce qui n'a aucune importance.

Le tube de bouillon est placé à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures. Après ce délai, il doit être aussi clair qu'au début. On a commis une faute d'asepsie s'il est trouble et l'essai est à recommencer.

On réensemence alors sur gélose lactosée tournesolée. Après vingt-quatre à quarante-huit heures, apparition d'une culture semblable à la première ; raclage de cette culture, émulsion en bouillon, réensemencement : les passages gélose lactosée tournesolée, bouillon, gélose lactosée tournesolée continuent. Sous réserve bien entendu que des vérifications soient constamment faites et qu'aucun saprophyte banal ne soit venu souiller les boîtes de gélose lactosée tournesolée.

Peu à peu, vers le 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> repiquage en général, on voit apparaître sur les boîtes, remplaçant le dépoli initial, des microcolonies. Elles vont augmenter en dimension et deviendront en principe vers le 7<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup> ou 10<sup>e</sup> passage des colonies normales et typiques du germe dont on s'est servi au début de l'expérience. Un bacille typhique, un bacille dysentérique, un colibacille, un bacille pesteux, un streptocoque, un staphylocoque, etc., un germe que l'on aura soumis à l'action du bactériophage dans les conditions décrites tout à l'heure « réapparaîtra » normal, semblable à lui-même, après être passé par une phase filtrable et invisible.

Dans tous ces essais, je ne saurais trop le répéter, les précautions les plus minutieuses doivent être prises pour éviter les pollutions par les microbes banaux. Une *Salmonella* doit redonner après ce cycle naissance à une *Salmonella* ; une *Pasteurella* à une *Pasteurella*, etc.

La preuve peut ainsi être faite de l'existence des FFI.

★★

On n'a pas manqué de faire des objections à ce processus inhabituel de « reproduction » de la bactérie, on a pensé qu'il s'agissait de faute de technique. Je ne discuterai pas de cette dernière



observation, car je ne sache pas que les bacilles d'Eberth, les *Shigella*, les bacilles pesteux soient des souillures habituelles de l'air.

Mais comment se fait-il, a-t-on dit, que dans un filtrat contenant initialement des « fragments bactériens » et du bactériophage, celui-ci ne continue pas son action et ne détruise pas en définitive ces résidus protoplasmiques ou nucléaires ?

En principe, il ne peut pas ne pas le faire.

Comment peut-on alors arriver à reconstituer une bactérie dans ces conditions ? L'explication de cet apparent paradoxe est facile.

Nous savons que les filtrats de lyse au moment de « l'opalescence » (fragments bactériens et bactériophage) maintenus en milieu liquide ne donnent que très lentement et très exceptionnellement une reconstitution du microbe initial. Ceci est parfaitement logique, compréhensible. Le phénomène se passe ici comme il doit se passer. La diminution de l'activité du bactériophage, sa disparition peut-être sous l'action du temps et de la chaleur de 37°, d'autres facteurs non éclaircis : autant de faits qui expliquent ce que nous observons.

*Mais, par contre, la dispersion sur un milieu solide (gélose lactosée tournesolée) des éclats bactériens et du bactériophage réalise l'une des meilleures conditions pour entraver l'action de celui-ci.*

Un contact microbe-ultravirus est nécessaire, en effet, pour la bactériophagie. Doerr, l'a signalé le premier et j'en ai donné l'explication [3] : la lyse ne se produit pas par exemple en milieu visqueux. Le microscope électronique nous a fait définitivement comprendre le pourquoi du phénomène, la nécessité de ce rapprochement. Le bactériophage ne tue pas la bactérie à distance.

Il est donc parfaitement compréhensible, qu'étalés sur un milieu solide, les phages se trouvant éloignés des éclats bactériens, ne pouvant pas se fixer sur eux, ceux-ci puissent végéter à nouveau et reconstituer lentement, avec une « peine » que l'aspect inhabituel des cultures nous montre, la bactérie entière dont ils ne sont que provisoirement des fragments.

Ainsi se trouve affirmée la réalité de l'existence des formes filtrables et invisibles des bactéries et le mécanisme à peu près certain de leur formation. Il est évident que de nombreux points ne sont pas encore éclaircis dans ce phénomène. La technique que j'ai publiée est probablement susceptible d'améliorations : l'étude précise de l'évolution morphologique, des qualités biochimiques des FFI est à peine amorcée.

J'ai montré le rôle probable des FFI dans l'étiologie de certaines maladies infectieuses, plus particulièrement dans les salmonelloses. Ici encore, de nombreux travaux seront nécessaires pour le compléter et le préciser.

Les rapports des FFI et des formes L sont presque entièrement à faire et, pour le moment, aucun fait expérimental ne permet d'affirmer ou de contredire leur identité.

Un autre fait important se dégage de ces recherches : dès 1924, en effet, il a été prouvé que les bactéries dont on pensait qu'elles ne pouvaient se reproduire que par scissiparité, possédaient un véritable cycle évolutif les faisant passer par une forme infiniment petite.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. HAUDUROY. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **401**, 1209.
- [2] P. HAUDUROY. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1949, n<sup>os</sup> 35 et 36, 669. On trouvera dans cette note toutes les références bibliographiques.
- [3] P. HAUDUROY. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 1463.



**INFLUENCE**  
**DES HAUTES PRESSIONS HYDROSTATIQUES**  
**SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'UNE PROTAMINE**  
**EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE**  
**D'ACIDE RIBONUCLÉIQUE**

par **PIERRE VIGNAIS** et **MICHEL MACHEBOEUF** † (\*).

*(Institut Pasteur.)*

Nous avons vu précédemment [1] qu'il n'avait pas été possible de mettre en évidence, après action des hautes pressions, une réversibilité de l'hydrolyse enzymatique de l'A. R. N.

Les travaux de Macheboeuf et coll. [2] arrivaient aux mêmes conclusions dans le cas d'hydrolysats protéiques. Ces résultats étaient en opposition avec ceux de Bresler [3].

Nous nous sommes demandé si cette contradiction ne pouvait pas s'interpréter de la façon suivante : une véritable synthèse de protéine aurait bien lieu sous pression comme le croit Bresler, mais, dans ces conditions, la protéine ne serait pas stable et elle subirait à la sortie de presse une hydrolyse rapide.

Pour élucider ce problème, il devenait nécessaire de mettre en évidence cette synthèse hypothétique pendant la compression même. La méthode la plus simple était d'utiliser un réactif capable de fixer cet état métastable.

Or, on sait que l'acide nucléique jouit de la propriété de se combiner aux protéines basiques sous forme de complexes précipitables. Au cours de nos essais, nous avons observé un fait intéressant : si, aux divers stades d'hydrolyse, on précipite des volumes semblables d'un hydrolysats de protéine basique par un volume donné d'une solution d'acide nucléique, on met en évidence une précipitation d'autant plus faible que l'hydrolyse est plus avancée. Il devenait ainsi possible de différencier dans un hydrolysats protéique soumis à la pression une réversibilité d'équilibre enzymatique en éliminant de la réaction, dès leur formation, les produits de polymérisation éventuels des peptides.

Nous pensions, en outre, éviter les dépolymérisations enzymatiques rapides qui pouvaient se produire à la sortie de la presse.

(\*) Manuscrit reçu le 23 novembre 1953.

I. ETUDE DES COMBINAISONS D'A. R. N.  
ET DES PRODUITS D'HYDROLYSE DES PROTAMINES.

Les associations entre acides nucléiques et protamines furent découvertes par Miescher en 1897 [4]. Les protamines sont considérées comme de grands polypeptides composés d'une forte proportion d'acides aminés basiques, parmi lesquels l'arginine est prédominant. Le groupement guanidinium de ce dernier leur confère une basicité élevée : il n'entre pas, en effet, dans la liaison peptidique. A côté de l'arginine existent d'autres acides aminés basiques et quelques mono-acides mono-amminés. La cystéine, la méthionine, le tryptophane et les acides dicarboxyliques font défaut dans la protamine que nous avons utilisée : la salmine. Dans cette substance il existe environ une molécule de mono-acide mono-amminé pour deux molécules d'arginine. Sa composition a été déterminée par Tristram [5] ; elle comprendrait les 58 résidus suivants : 40 molécules d'arginine, 1 d'isoleucine, 2 de valine, 4 de proline, 3 de glycine, 1 d'alanine, 7 de sérine. Son poids moléculaire est de 8 000.

Lorsque le pH est convenable, les protamines peuvent se combiner soit avec les protéines acides, soit avec les acides nucléiques pour former des complexes insolubles [6, 7].

De quelle nature sont les liaisons qui unissent acides nucléiques et protamines ? Elles peuvent se rompre sous l'action de solutions salines concentrées : il s'agirait donc là de liaisons électrovalentes ; des forces électrostatiques exerceraient une attraction entre des groupes phosphorylés de l'acide nucléique et des groupes chargés positivement de la partie protéique (groupe  $\epsilon$ -aminé de l'arginine par exemple). Cependant, les liaisons entre acides nucléiques et protéines non basiques dans les nucléoprotéines natives sont d'une stabilité plus élevée. Dans ce cas l'alcali agirait sur des liaisons apolaires et son mode d'action s'effectuerait de différentes manières :

- 1° Hydrolyse d'une liaison ester ;
- 2° Dénaturation de la protéine et nouvel arrangement intramoléculaire ;
- 3° Formation pour la protéine d'un anion qui repousse l'anion similairement chargé [8].

ESSAIS EXPÉRIMENTAUX. — Ces essais nous ont montré qu'il était possible de suivre, grâce à la précipitation par l'acide nucléique, la marche de l'hydrolyse de la salmine. L'enzyme hydrolysant était de la trypsine (Etablissements « LTD British Drug Houses »). Nous l'avons purifiée de la manière suivante : après l'avoir mise en suspension dans de l'eau bidistillée légèrement acidifiée (pH 3) nous avons recueilli la partie soluble par



filtration ; cet extrait a été lyophilisé. La trypsine ainsi préparée se dissout très facilement dans l'eau et possède une notable activité protéolytique.

Nous avons utilisé de la salmine commerciale (Etablissements Hofmann-Laroche) en solution dans un tampon phthalate de pH 5,6 et de force ionique 0,063 ; le pH final après dissolution est, dans ces conditions, de 5,68. Ce même tampon sert à dissoudre notre A. R. N. [échantillon N<sub>2</sub>] (1).

a) Dans un premier essai nous avons recherché de quelle façon variait la quantité de précipité de nucléoprotamine lorsque, à un même volume de solution de protamine, nous ajoutons des volumes croissants de solution d'acide ribonucléique.

La concentration choisie était la même pour la salmine et l'A. R. N. : 5 mg/ml.

Nous répartissons 0,2 ml de solution de salmine dans 5 tubes ; puis dans chacun nous ajoutons des volumes différents de solution d'A. R. N. Ces volumes s'échelonnent entre 0,1 et 5 ml : le rapport  $\frac{\text{A. R. N.}}{\text{protamine}}$  varie ainsi de 0,5 à 25. Par addition d'eau distillée nous amenons le volume final à 5,2 ml. La formation du précipité de nucléoprotamine est appréciée par opacimétrie au moyen de l'électrophotomètre de Meunier avec l'écran rouge orangé.

TABLEAU I (\*).

Millilitres de solution de protamine .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Millilitres de solution d'A. R. N. . .	0,1	0,2	0,5	3	5
A. R. N.					
protamine . . . . .	0,5	1	2,5	15	25
Turbidité. . . . .	36	60	129	195	200

(\*) Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux divisions du tambour du photomètre.

En somme, la masse de précipité n'augmente plus lorsque le rapport  $\frac{\text{A. R. N.}}{\text{protamine}}$  dépasse 15. A ce moment une faible variation dans la quantité d'A. R. N. ajouté intervient très peu dans la précipitation. Par contre, une légère variation dans les proportions de protamine pourrait facilement être mise en évidence.

C'est dans ces conditions que nous nous sommes placés. Pratiquement, nous avons choisi le mode de précipitation suivant :

(1) Notons que le pH que nous avons choisi n'est certes pas optimum pour l'activité trypsique ; il permet néanmoins une hydrolyse convenable tout en étant compatible avec une bonne stabilité de l'A. R. N.

1 volume de solution de protamine pour 20 volumes de solution d'A. R. N.

b) Dans une deuxième expérience nous avons montré que certains produits d'hydrolyse partielle de la salmine par de la trypsine peuvent entrer en liaison avec des polynucléotides pour former des combinaisons insolubles. De temps à autre, au cours de l'hydrolyse, nous prélevons un volume de l'hydrolysât et nous

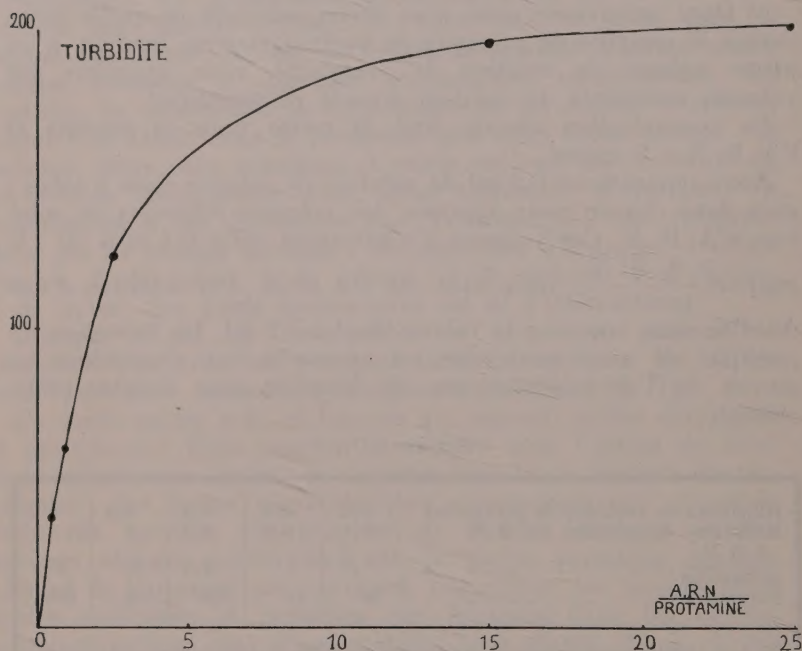


FIG. 1.

ajoutons 20 volumes de solution nucléique. Dans le cas présent, à 0,25 ml de solution de salmine, nous ajoutons 5 ml de solution nucléique. Les suspensions ainsi obtenues sont divisées en trois fractions qui servent respectivement :

A la mesure de turbidité ;

Au dosage d'azote ;

Au dosage de phosphore.

Le phosphore et l'azote étaient dosés dans le précipité recueilli par centrifugation de 2 ml de suspension. Nous rapportons dans le tableau II les chiffres de phosphore et d'azote qui caractérisent la quantité de précipité, c'est-à-dire la marche de l'hydrolyse.



Ces valeurs sont exprimées en microgrammes et correspondent à 5,25 ml de solution.

Dans une colonne spéciale nous avons inscrit les mesures d'opacité.

TABLEAU II.

TEMPS D'HYDROLYSE en minutes	MICROGRAMMES d'azote	MICROGRAMMES de phosphore	OPACITE
0. . . . .	208	82	115
25. . . . .	110	41	56
120. . . . .	86	32	10

On note un excellent parallélisme entre les variations du phosphore et celles de l'azote. Par contre, l'opacimétrie, comme il fallait s'y attendre, n'est qu'un moyen approximatif d'appréciation de l'abondance du précipité ; mais ce test suffira pour la plupart des essais ultérieurs.

Les quantités d'azote du tableau II correspondent à la somme de l'azote de l'acide nucléique et de l'azote de la salmine ; connaissant les teneurs en phosphore de l'acide ribonucléique, nous pouvons facilement calculer les quantités respectives d'azote de la salmine et de l'A. R. N. Les résultats obtenus sont exprimés en microgrammes d'azote (tableau III).

D'après les proportions théoriques de phosphore dans les nucléotides : 9,6 p. 100, et d'azote dans la protamine : 32 p. 100, nous pouvons connaître la proportion des nucléotides qui entrent en combinaison avec la protamine : 854 microgrammes d'A. R. N.

TABLEAU III.

TEMPS D'HYDROLYSE en minutes	MICROGRAMMES d'azote dans la protamine	MICROGRAMMES d'azote dans l'A. R. N.
0. . . . .	68,6	139,4
25. . . . .	40,3	69,7
120. . . . .	31,6	54,4

pour 210 microgrammes de protamine avant l'hydrolyse. Dans ces proportions, tous les groupes aminés de la protamine seraient combinés à des groupes acides phosphoriques de l'acide nucléique. Il existe en quelque sorte une « saturation » de la protamine par l'A. R. N.

D'autre part, nous constatons qu'au cours de l'hydrolyse de la

salmine, la proportion d'A. R. N. qui se combine pour former un précipité est d'autant plus faible que l'hydrolyse est plus avancée. L'A. R. N. présente donc une affinité pour les molécules de salmine intactes ou tout au moins peu modifiées par hydrolyse. Par conséquent, si *sous l'influence de la pression* se produisait une réversibilité dans l'hydrolyse protéique, les grosses molécules synthétisées seraient à ce moment fixées par l'A. R. N. Ce fait intéressant nous a permis de suivre la marche d'une hydrolyse enzymatique de protamine sous pression et dans des conditions normales.

## II. — ETUDE DE L'HYDROLYSE DE SOLUTIONS DE SALMINE SOUMISES AUX ULTRAPRESSIONS EN PRÉSENCE ET EN L'ABSENCE D'A. R. N.

EXPÉRIENCE I. — La protamine est dissoute dans la proportion de 5 mg/ml ; la trypsine est introduite dans le liquide à la concentration de 0,1 mg/ml.

Après soixante minutes d'hydrolyse nous prélevons une partie aliquote d'hydrolysats que nous comprimons à 14 000 kg/cm<sup>2</sup> pendant trois heures à 37° C.

Une autre partie de l'hydrolysats est additionnée d'acide nucléique dans les proportions suivantes : 1 volume de solution de protamine pour 20 volumes de solution d'acide nucléique à 5 mg/ml. Une fraction de cette suspension est soumise également à 14 000 kg/cm<sup>2</sup>.

Pendant que sont comprimés l'hydrolysats de protamine et la solution de nucléoprotamine, des échantillons restent à la pression atmosphérique à une température de 37° C. Ces échantillons ont été, eux aussi, enfermés dans des sacs de caoutchouc identiques à ceux qui sont mis en presse. Nous avons, en effet, constaté le rôle important de certains facteurs tels que l'oxygène ou les agents réducteurs sur la variation de turbidité des précipités du nucléoprotamine (2).

Nous avons, par ailleurs, soumis un échantillon de solution

(2) A titre d'exemple, voici les résultats de mesures opacimétriques pour un mélange d'A. R. N. et de salmine partiellement hydrolysée après une heure de séjour dans des conditions diverses :

A l'air :

Sans hydroquinone. . . . .	46
Avec hydroquinone. . . . .	57

En sac de caoutchouc :

Sans hydroquinone. . . . .	31
Avec hydroquinone. . . . .	38

Ce fait inattendu mériterait une étude particulière.



nucléique pendant trois heures à 14 000 kg/cm<sup>2</sup>. Nous avons effectué une précipitation d'un hydrolysate de protamine (soixantième minute) par cet acide ribonucléique : ceci constituait en quelque sorte un témoin et permettait d'apprécier la part qui revenait à l'acide nucléique comprimé dans les variations de la combinaison de nucléoprotamine sous les hautes pressions.

En somme, grâce à la précipitation par l'A. R. N., on apprécie la marche de l'hydrolyse de la salmine à la pression atmosphérique et sous les hautes pressions. Le tableau IV donne le résultat des mesures opacimétriques (graduations lues sur le tambour de l'électrophotomètre de Meunier).

TABLEAU IV.

TEMPS D'HYDROLYSE en minutes	HYDROLYSAT de protamine Témoin	HYDROLYSAT de protamine 14 000 kg/cm <sup>2</sup>	HYDROLYSAT de protamine + A. R. N. 14 000 kg/cm <sup>2</sup>
0	198		
8	80		
30	41		
Mise en pression. . . 60	20	20	20
Décompression . . . 240	3	13	30

D'autre part, la solution d'acide nucléique comprimée pendant trois heures à 14 000 kg/cm<sup>2</sup> précipite plus nettement l'hydrolysate de protamine (soixantième minute d'hydrolyse) que la solution d'acide nucléique non comprimée. Les valeurs opacimétriques sont 31 pour l'échantillon comprimé et 20 pour le témoin. Ce phénomène pourrait être rapproché de celui constaté lors de la précipitation par l'acide acétique de solutions d'A. R. N. comprimée [9].

*En conclusion*, l'hydrolyse de la solution de protamine en l'absence d'acide ribonucléique évolue moins rapidement à 14 000 kg/cm<sup>2</sup> qu'à la pression atmosphérique. En effet, en cent quatre-vingts minutes le chiffre de turbidité est passé de 20 à 3 pour l'échantillon laissé à la pression atmosphérique, tandis que pour celui qui a été soumis pendant le même temps à 14 000 kg/cm<sup>2</sup> cette valeur est passée de 20 à 13 seulement.

La suspension de nucléoprotamine, qui a été soumise à 14 000 kg/cm<sup>2</sup> présente à la sortie de presse un degré d'opacité plus élevé qu'avant compression (30 au lieu de 20). Ce résultat pourrait en imposer pour une resynthèse de l'hydrolysate de protamine. Mais il semble uniquement en relation avec le fait que

l'A. R. N., après compression, possède la propriété de former des précipités plus abondants de nucléoprotamine.

EXPÉRIENCE II. — Les pressions mises en œuvre ici sont 1 850 kg/cm<sup>2</sup> et 6 000 kg/cm<sup>2</sup>. Nous avons recherché l'influence de telles compressions sur des hydrolysats de protamine arrivés

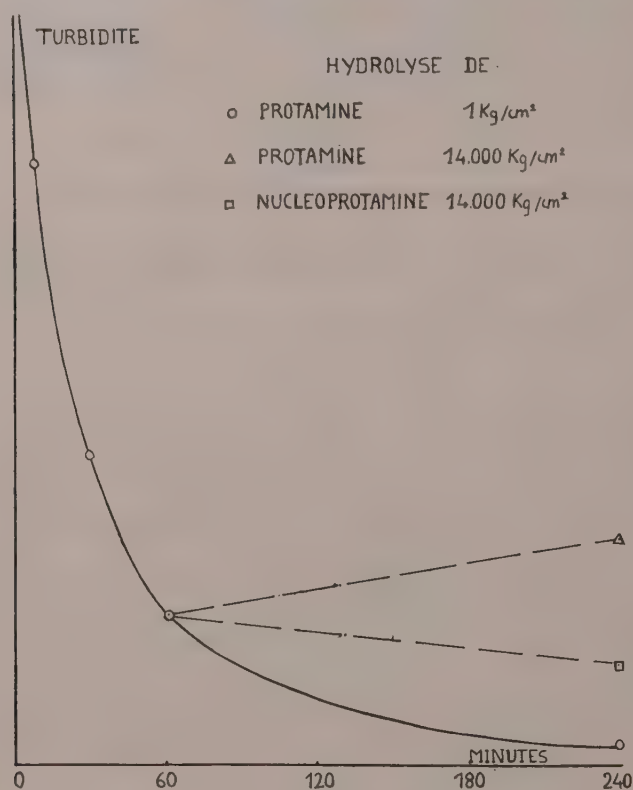


FIG. 2.

à un stade moins avancé que dans l'expérience précédente. Les concentrations d'acide nucléique et de salmine étaient de 3 mg/ml, celle de trypsine de 0,05 mg/ml. Par ailleurs, le protocole expérimental reste le même. Les résultats sont notés dans le tableau V.

De même que dans l'expérience I, nous avons comprimé indépendamment deux échantillons de la solution d'A. R. N. à 6 000 kg/cm<sup>2</sup> et à 1 850 kg/cm<sup>2</sup> pendant deux heures. Nous les avons ajoutés à l'hydrolysat de salmine (trentième minute). Les valeurs opacimétriques qui rendent compte de la formation de

TABLEAU V.

TEMPS D'HYDROLYSE en minutes	HYDROLYSAT de protamine témoin	HYDROLYSAT de protamine		HYDROLYSAT de protamine + A.R.N.	
		1 850 kg/cm <sup>2</sup>	6 000 kg/cm <sup>2</sup>	1 850 kg/cm <sup>2</sup>	6 000 kg/cm <sup>2</sup>
0	114				
3	78				
Mise en pression . . . 35	36	36	36	36	36
Décompression . . . . 180	2	6	18	23	26

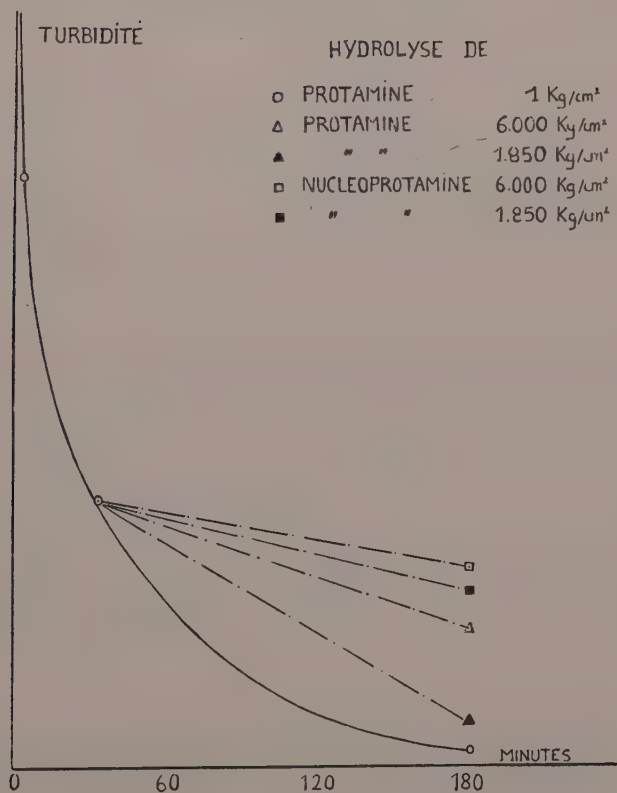


FIG. 3.



nucléoprotamine sont de 36 pour 1 850 kg/cm<sup>2</sup>, 37 pour 6 000 kg/cm<sup>2</sup> et 36 pour la solution nucléique restée à la pression atmosphérique. Les précipités obtenus sont donc du même ordre de grandeur dans les différents cas. Notons que ce résultat diffère de celui obtenu dans la première expérience pour une pression beaucoup plus forte : 14 000 kg/cm<sup>2</sup>.

Les résultats du tableau V nous amènent aux conclusions suivantes :

L'hydrolyse de la salmine en absence d'A. R. N. continue de progresser sous pression. La vitesse de l'hydrolyse est d'autant plus faible que la pression est plus élevée. Dans tous nos essais elle est inférieure à la vitesse d'hydrolyse à la pression atmosphérique.

Les suspensions de nucléoprotamine soumises à des pressions de 6 000 kg/cm<sup>2</sup> et 1 850 kg/cm<sup>2</sup> subissent une légère diminution d'opacité. Ceci peut être interprété comme le résultat d'une attaque enzymatique de la salmine, même combinée à l'acide ribonucléique. Cette hydrolyse est cependant nettement moins marquée qu'en absence d'A. R. N.

#### RÉSUMÉ.

Nous avons recherché l'influence des hautes pressions sur l'évolution de l'hydrolyse d'une protamine : la salmine. La méthode utilisée pour apprécier l'état d'hydrolyse consiste à stopper cette hydrolyse par addition d'A. R. N. La quantité de précipité de nucléoprotamine formée est d'autant plus faible que l'hydrolyse est plus avancée. Les résultats obtenus indiquent que l'hydrolyse enzymatique de la salmine continue d'évoluer sous pression.

Mais ces résultats n'excluaient pas la formation, sous pression, de produits de synthèse sous un état instable ; pour mettre en évidence ces produits éventuels, il était nécessaire de les fixer sous une forme stable. Nous avons montré l'affinité de l'A. R. N. pour les molécules de protamine peu ou pas hydrolysées. Ainsi, si l'on soumet à la pression un hydrolysât de protamine en présence d'A. R. N., les molécules protéiques resynthétisées doivent se combiner immédiatement à l'A. R. N. et donner un précipité de nucléoprotamine. Par ce procédé nous n'avons pas pu mettre en évidence la synthèse, sous les hautes pressions, de protéines à partir d'un hydrolysât. Ces résultats contredisent les affirmations de Bresler.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. VIGNAIS et M. MACHEBOEUF. Ces *Annales*, 1953 (*sous presse*).
- [2] M. MACHEBOEUF, J. BASSET, E. BARBU, LE SAGET, NUNEZ. *Bull. Soc. Chim.*, 1951, **48**, 471.

- [3] S. E. BRESLER et V. L. GLIKINA. *Biochimia*, 1947, **12**, 389.
- [4] MIESCHER. *Die histochemischen und physiologischen Arbeiten*, Vol. II, Leipzig, 1897.
- [5] TRISTRAM. *Nature*, 1947, **160**, 637.
- [6] LISSITZIN et ALEXANDROWSKAJA. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1933, **221**, 156.
- [7] KOSSEL. *The protamines and Histones*, London, 1928.
- [8] A. BOIVIN. *Exp. Bioch. med.*, 1944, **4**, 7.
- [9] P. VIGNAIS. *Ces Annales* (sous presse).

## MISE EN ÉVIDENCE DU POUVOIR HÉMAGGLUTINANT DU VIRUS CHORIOTROPE

par P. LÉPINE et R. DE RUYCK (\*).

(*Institut Pasteur, Service des Virus.*)

Les recherches poursuivies par l'un de nous ont montré qu'il était possible d'isoler un virus à partir de môles hydatiformes et de chorio-épithéliomes. Jusqu'ici 15 cas de ces tumeurs ont été examinés et dans chaque cas, il a été possible de mettre en évidence la présence d'un virus qui induit chez l'embryon de poulet des lésions spécifiques [1, 2]. Au cours de l'étude du virus il a pu être montré que ce dernier est transmissible au poulet adulte chez lequel il provoque, entre autres lésions, la formation de vastes plasmodies multinucléés vasculaires et qui pourraient peut-être préfigurer, dans une lésion plus avancée, les plages syncytiales que l'on observe dans les lésions primitives ou métastatiques de chorio-épithéliomes, aussi bien dans les formes gravidiques que dans les formes ectopiques [3].

La môle hydatiforme et le chorio-épithéliome sont jusqu'ici inconnus en pathologie vétérinaire, et toutes les tentatives que nous avons faites pour induire des tumeurs de ce type chez les mammifères sont restées infructueuses.

En vue de préciser le diagnostic et d'éclaircir l'étiologie virale de ces tumeurs, nous avons entrepris l'étude de leur pouvoir antigénique et nous avons recherché l'application possible de méthodes sérologiques. Nous avons essayé, dans ce but, l'application d'une réaction d'inhibition de l'hémagglutination en faisant agir, d'une part le virus isolé à partir de tumeurs chorio-épithéliales, et d'autre part, les anticorps qu'il pourrait provoquer dans le sérum des animaux sensibles.

Le problème du pouvoir hémagglutinant du virus choriotrope a d'abord été étudié, et ce sont les résultats de ce travail qui font l'objet de la présente communication.

### A. — PRÉPARATION DES ANTIGÈNES.

a) ANTIGÈNE VITELLIN. — Les essais d'hémagglutination que nous avons d'abord tentés avec le liquide allantoïque vis-à-vis des

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 janvier 1954.



hématies de poulet, sont longtemps restés infructueux. Nous avons alors utilisé le sac vitellin.

Pour préparer un antigène vitellin, nous inoculons par voie vitelline des œufs de huit jours et nous effectuons les prélèvements huit jours après. Le sac est lavé et immédiatement broyé au mortier, mis en suspension dans 25 cm<sup>3</sup> de sérum physiologique, et centrifugé à faible vitesse. Le liquide surnageant est ensuite ultra-centrifugé à 25 000 *g* pendant quarante-cinq minutes et le culot remis en suspension dans 10 cm<sup>3</sup> de sérum physiologique. Cette suspension est ensuite purifiée par centrifugation fractionnée et soumise à une deuxième ultra-centrifugation à 25 000 *g* pendant quarante-cinq minutes. Le dernier culot est resuspendu dans 3 cm<sup>3</sup> de sérum physiologique par membrane. C'est cette dernière suspension de virus qui sert d'antigène après addition de merthiolate à 1 : 10 000.

Un tel antigène permet d'obtenir de très belles hémagglutinations avec des hématies d'environ cinq poulets sur dix. Les titres varient d'un sac vitellin à l'autre de 1 : 1 200 à 1 : 5 000.

b) ANTIGÈNE ALLANTOÏQUE. — Une fois que le pouvoir hémagglutinant du virus choriotope fut démontré, nous avons repris systématiquement les expériences avec les liquides allantoïque et amniotique.

Dans le liquide amniotique, ainsi que dans le liquide des vésicules molaires expérimentales, pourtant très infectieuses, nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence un pouvoir hémagglutinant. Nous pensons que ceci tient à la présence d'inhibiteurs dans ces liquides.

Par contre, le liquide allantoïque d'œufs inoculés à 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-5</sup>, prélevé quatre et cinq jours après, a fourni un bon antigène. Nous soulignons à ce propos que, pour que l'inoculation par voie allantoïque soit efficace, il est important d'opérer avec des dilutions convenables de virus. En effet, lorsque le matériel virulent est inoculé à des concentrations trop élevées, on obtient en général de mauvais antigènes. Mais dans de bonnes conditions, 50 p. 100 des poulets fournissent des hématies agglutinables par le liquide allantoïque.

Afin d'étudier les conditions optima dans lesquelles ces deux antigènes pouvaient être employés dans des tests sérologiques, nous avons entrepris des recherches préliminaires sur les propriétés des hématies employées, sur la nature de l'antigène, et sur les conditions dans lesquelles l'agglutination s'effectue.

Ceci nous a amenés à préciser un certain nombre de points.

#### B. — RÉSULTATS.

1° Environ 50 p. 100 des poulets fournissent des hématies agglutinables par les deux antigènes. Cependant le comportement

de ces hématies vis-à-vis des antigènes allantoïques et vitellins ne semble pas être rigoureusement le même.

L'utilisation de l'antigène vitellin nous a permis d'observer avec deux souches de virus sur trois, une *hémolyse* associée à l'agglutination. Cette hémolyse est complète en douze à vingt-quatre heures à la température ordinaire et en trente minutes à la température de l'étuve à 37° C. Elle est pratiquement inexistante lorsqu'on opère à la température de la glacière. Elle fait complètement défaut en présence d'un antigène allantoïque.

Nous pensons que l'infection avec le virus choriotrope induit dans le sac vitellin la formation d'une hémolysine, qui fait défaut dans l'allantoïde.

2° Avec l'antigène vitellin, l'agglutination est toujours complète et uniforme du premier au dernier tube (tableau I. A).

TABEAU I. — En hachuré, zone d'inhibition de l'hémagglutination.

		$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$
A	ANTIGÈNE VITELLIN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{2}$	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{3}$	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{4}$	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{6}$	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{4}$	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{6}$	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	ANTIG. ALLANT. $\frac{7}{4}$ } $\sigma\sigma$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ANTIG. ALLANT. $\frac{7}{6}$ }	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{4}$	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	CULOT DE CENTRIFUGATION	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{4}$	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	ANTIGÈNE ALLANT. $\frac{7}{4}$	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Par contre, avec l'antigène allantoïque, on observe presque toujours une phase d'inhibition aux faibles dilutions (tableau I. B).

Lorsqu'on prélève le liquide allantoïque cinq à six jours après l'inoculation, il est presque impossible de mettre une hémagglutination en évidence. Tout se passe comme si le liquide allantoïque était le siège d'une production précoce d'*inhibiteurs*, qui ne s'observe pas au niveau du sac vitellin et qui croît à mesure que l'incubation de l'œuf se poursuit. La présence de ces inhibiteurs peut être facilement démontrée en mélangeant à parties égales un antigène allantoïque actif avec le liquide allantoïque d'un œuf de treize ou quatorze jours. On observe alors toujours une inhibition de l'agglutination (tableau I. C).

3° Nous avons dit qu'environ 50 p. 100 des poules donnaient

de bonnes hématies, mais il semble que toutes les hématies ne soient pas également agglutinables par toutes les souches de virus (tableau II).

TABLEAU II. — Sensibilité des hématies de poules aux divers antigènes.

	POULE 544	POULE 542	POULE 548
ANTIGÈNE VITELLIN $M_{10}O_3$ TITRE :	+	+	—
	1280	160	
ANTIGÈNE VITELLIN $M_{12}O_7$ TITRE :	+	+	+
	1280	320	640
ANTIGÈNE ALLANTOIQUE $M_{13}O_7$ TITRE :	+	—	+
	640		

Ainsi, par exemple, l'antigène vitellin  $M_{10}O_3$  (10<sup>e</sup> môle, 3<sup>e</sup> passage sur œuf) n'agglutine pas les hématies de la poule 548, tandis que celles-ci sont agglutinées par l'antigène vitellin  $M_{12}O_7$  et par l'antigène allantoïque  $M_{13}O_7$ .

On peut penser que l'affinité du virus pour les hématies est elle-même sous la dépendance de facteurs qui varient d'une poule à l'autre et qui pourraient, dans une population hétérogène d'animaux, refléter un caractère génétique.

4<sup>e</sup> Les stocks d'hématies peuvent aussi différer les uns des autres dans la facilité plus ou moins grande qu'ils ont d'éluer le virus adsorbé. Dans la majorité des cas, les hématies éluent le virus assez rapidement à la température ordinaire. Déjà au bout de trente minutes l'hémagglutination disparaît dans les premiers tubes. Après séparation des hématies du liquide dans lequel la réaction a eu lieu, celles-ci ne sont plus agglutinables au cours d'une deuxième réaction. Par contre, le liquide surnageant récupère presque intégralement son pouvoir agglutinant.

Cependant il se trouve des hématies agglutinant avec plusieurs souches de virus et qui, après plusieurs heures, ne commencent pas à sédimenter. Lorsqu'on les remet en suspension en les agitant, on observe après une demi-heure une deuxième agglutination normale, qui semble vouloir se maintenir. Dans ce cas, le liquide surnageant a perdu son pouvoir hémagglutinant et il semble que l'antigène reste fixé sur les hématies.

Il ne peut s'agir dans ce cas d'une hémagglutination spontanée, puisque le même phénomène ne s'observe pas avec le liquide allantoïque normal.

Nous pensons, si l'on admet la théorie du récepteur de virus, que celui-ci doit présenter une résistance à l'action du virus, susceptible de varier d'une poule à l'autre. Une variabilité dans la fragilité du récepteur semble découler aussi du fait que certaines hématies, parfaitement agglutinables, semblent être très



sensibles à l'action du lavage, et perdre rapidement leurs propriétés d'agglutinabilité, tandis que d'autres hématies peuvent subir des lavages répétés sans devenir pour cela inutilisables.

5° Nous avons essayé dans les mêmes conditions trois variétés d'hématies : hématies de poulet, hématies de lapin, hématies du groupe O. Seules les hématies de poulet nous ont donné des résultats, et ni avec les hématies de lapin, ni avec les hématies humaines, nous n'avons jamais observé d'hémagglutination.

6° En ce qui concerne la nature de l'antigène hémagglutinant, nous avons pu mettre en évidence qu'il était formé de particules relativement volumineuses. En effet, un antigène soumis à une ultracentrifugation à 25 000 *g* pendant quarante-cinq minutes perd complètement son pouvoir hémagglutinant. Par contre, celui-ci se retrouve presque intégralement dans le culot de centrifugation remis en suspension dans la même quantité de sérum physiologique (tableau I. D).

7° Afin de vérifier que l'hémagglutination observée avec nos antigènes était bien due à un phénomène spécifique nous avons pratiqué des réactions d'inhibition avec des sérums normaux et avec des sérums hyperimmuns.

Les sérums normaux que nous avons examinés étaient : sérum normal de lapin, sérum normal humain, sérum de femme enceinte, sérum de jument gravide. Des dilutions décroissantes de ces sérums, préalablement décomplémentés, en présence de 4 doses hémagglutinantes mettent en évidence la présence d'inhibiteurs non spécifiques dont les taux sont relativement constants et oscillent aux environs de 1 : 32 et 1 : 64.

Les sérums hyperimmuns furent préparés de la manière suivante : des antigènes allantoïques de titre  $10^{-3}$  environ, sont mélangés et centrifugés à 25 000 *g* pendant quarante-cinq minutes ; le culot de centrifugation, contenant les particules antigéniques, est remis en suspension dans un quart du volume initial d'eau distillée et inoculé par voie intrapéritonéale au lapin, à raison de trois injections de 2 cm<sup>3</sup>, à huit jours d'intervalle ; quinze jours après la dernière inoculation le lapin est saigné au cœur et le sérum testé en présence d'un témoin normal. Dans ces conditions, on obtient avec les sérums hyperimmuns une inhibition de l'hémagglutination qui atteint des titres de 1 : 512 à 1 : 1 024.

Quelques tests d'inhibition que nous avons entrepris avec des sérums de malades ou de convalescentes ne nous permettent pas jusqu'ici de tirer des conclusions d'ordre diagnostique ou pronostique.

#### C. — CONCLUSIONS.

Il ressort de nos recherches que le virus choriotope présente un pouvoir hémagglutinant spécifique et bien défini, à condition

d'observer pour le mettre en évidence un certain nombre de conditions préalables.

Les œufs doivent être inoculés avec des dilutions convenables de virus, les hématies doivent être soigneusement testées, et il est essentiel de se mettre à l'abri d'inhibiteurs présents dans les antigènes.

Nous pensons qu'en opérant dans des conditions standardisées et précises, il sera peut-être possible d'appliquer le test d'inhibition de l'hémagglutination à l'étude de l'étiologie virale de la môle hydatiforme et du chorio-épithéliome, et de suivre ainsi les réactions immunologiques qui accompagnent la régression spontanée ou la dégénérescence maligne de ces tumeurs.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. DE RUYCK. *Bull. Cancer*, 1951, **38**, 52-71.
- [2] R. DE RUYCK. *Bull. Cancer*, 1951, **38**, 252-268.
- [3] R. DE RUYCK. *Bull. Cancer*, 1953, **40**, 78-86.
- [4] P. LÉPINE et R. DE RUYCK. *V<sup>e</sup> Congrès International de Microbiologie, Rome 1953, Riassunti delle Comunicazioni*, Rome, 1953, **2**, 66-67.

## POUVOIR NEUTRALISANT DES SÉRUMS ÉTALONS ANTI-ŒDEMATIENS, ANTI-SEPTICUM ET ANTI-HISTOLYTICUM

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER, M. GEOFFROY et G. READE (\*).

(Institut Pasteur.)

Pour déterminer l'activité antitoxique de différents sérums anti-œdématisiens de type A *fraîchement prélevés*, nous avons fait agir chaque sérum sur deux poids très différents d'une toxine œdématisiens homologue élaborée en bouillon Vf par la souche Delombe. Nous avons cherché à préciser : 1° le volume de sérum qui neutralise presque intégralement la nocivité de 5 mg de cette toxine (la moitié des souris qui reçoivent ce volume de sérum et ce poids de toxine survivent) ; 2° le volume du même sérum qui supprime presque toute la nocivité de 0,5 mg de la même toxine (50 p. 100 environ des souris injectées dans ces conditions survivent). Nous avons fait le rapport entre ces 2 volumes de sérum et confronté les résultats de tous les titrages. Nous avons constaté que ce rapport est souvent égal à 10, mais s'élève parfois à 20, 30 ou 70 [4]. Par conséquent, les volumes de sérum frais qu'il faut employer pour neutraliser des quantités de toxine œdématisiens variant de 10 à 1 ne sont pas toujours directement proportionnels aux quantités de toxine employées ; certains sérums frais, mis en contact avec un faible poids de toxine œdématisiens, apparaissent deux à sept fois plus actifs que ne l'avaient fait prévoir les calculs appliqués aux résultats des titrages réalisés en présence d'un poids de toxine œdématisiens dix fois plus fort (1). Signalons que le *surcroît d'activité* de ces immunsérums disparaît rapidement à 56° ou en quelques mois à la température ambiante [4] ; ajoutons que le titre de ces divers sérums a été

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 janvier 1954.

(1) Voici un exemple : un de nos sérums anti-œdématisiens fraîchement prélevé devait être employé à la dose de 1/700 ml pour neutraliser 5 mg de toxine œdématisiens. Il suffisait de 1/50 000 ml de ce sérum pour neutraliser 0,5 mg de la même toxine ; la neutralisation de cette dernière dose de toxine aurait dû exiger, en principe, 1/7 000 ml de sérum.



évalué en présence d'une préparation de toxine *œdematiens* étiquetée OE10 dont nous parlerons plus loin.

A la suite de ces observations, nous avons groupé différents résultats que nous avons antérieurement obtenus en utilisant des doses variables de sérum étalon anti-*œdematiens* pour titrer plusieurs préparations de toxine *œdematiens* : nous avons déterminé les poids de toxine qui sont respectivement neutralisés par une unité, un quart d'unité ou 1/10 d'unité antitoxique de sérum étalon. Nous avons poursuivi ces recherches.

*Définitions.* — Il est d'usage d'appeler dose L + d'une toxine le poids de toxine qui, en présence d'une unité antitoxique étalon, tue la moitié environ des souris injectées. Pour la commodité de l'exposé, nous désignerons par L+/4 et L+/10 les poids respectifs de toxine *œdematiens* qui, en présence d'un quart ou d'un dixième d'unité antitoxique homologue, tuent environ la moitié des souris inoculées.

Nous avons étendu à d'autres toxines gangréneuses de semblables définitions. Nous avons déterminé les doses L+ et L+/4 de 3 toxines *septicum* et de 4 toxines *histolyticum* en présence d'une unité et d'un quart d'unité antitoxique des sérums étalons correspondants.

Rappelons que les divers sérums étalons anti-gangréneux sont conservés à l'état sec, à Londres et à Copenhague, et délivrés en solution glycinée.

*Toxines employées.* — Nous avons expérimenté avec des toxines préparées en bouillon Vf, précipitées par le sulfate neutre d'ammonium, desséchées à poids constant puis conservées à la température de 2° dans des ampoules scellées sous le vide [2]. Ces toxines ont été élaborées par les souches suivantes : Delombe (*Cl. œdematiens* type A) ; Letivi (*Cl. histolyticum*) ; Feunten et 5 (*Cl. septicum*).

*Conditions générales des titrages.* — Nous prenons de l'eau physiologique pour dissoudre les toxines, diluer les sérums étalons et amener au même volume les mélanges de toxine et de sérum ; nous laissons les divers mélanges pendant quarante-cinq minutes à 37° avant de les inoculer à des souris blanches de 17 à 20 g : les inoculations sont faites sous la peau quand les toxines à titrer sont des toxines *œdematiens* ; par voie veineuse dans les cas des toxines *septicum* et *histolyticum*. Chaque mélange est préparé en quantité suffisante afin de pouvoir injecter quatre souris dans les mêmes conditions (0,5 ml par souris) ; les souris sont observées pendant trois jours.

Les titrages préliminaires précisent le poids de toxine qui est neutralisé par une unité d'antitoxine étalon. Ils sont effectués ainsi : dans une série de verres, nous répartissons des quantités décroissantes de la solution de toxine ; dans tous les verres, nous introduisons 5 unités d'antitoxine homologue (un millilitre de sérum étalon convenablement dilué) ; puis nous ajoutons de l'eau physiologique pour que le volume final des différents mélanges soit de 2,5 ml. Par conséquent, 0,5 ml de chaque mélange contient un poids connu de toxine et une unité d'antitoxine correspondante.

Au cours des titrages ultérieurs, nous recherchons *simultanément* les

valeurs comparatives des doses  $L+$ ,  $L+/4$  et  $L+/10$  d'une même toxine. Le titrage définitif est fait en double.

Toutes les toxines sont pesées sur une balance sensible au  $1/10$  de mg ; les volumes sont mesurés avec des pipettes et des seringues de précision.

#### RÉSULTATS DES TITRAGES DE LA TOXINE *œdematiens*.

Nous avons utilisé l'étalon anti-*œdematiens* danois pour titrer les 4 préparations suivantes de toxine *œdematiens* : OE6, OE9, OE10 et OE11. Cet étalon contient 20 unités antitoxiques par ml. Pour indiquer brièvement nos résultats, nous employons les symboles  $L+$ ,  $L+/4$  et  $L+/10$ , que nous avons précédemment définis.

TOXINE OEDEMATIENS OE6. — La dose  $L+$  de cette toxine est égale à 3,4 mg. En partant de ce résultat expérimental, nous pensions qu'un quart d'unité antitoxique du sérum étalon anti-*œdematiens* employé neutraliserait 0,85 mg de la même toxine. Les titrages ont montré ceci : 1° la dose  $L+/4$  de la toxine OE6 est de 0,95 mg : elle dépasse de 10 p. 100 la valeur prévue par le calcul ; 2° la dose  $L+/10$  de la même toxine atteint 0,45 mg ; par conséquent  $1/10$  d'unité anti-*œdematiens* manifeste une activité antitoxique supérieure de 24 p. 100 à celle que nous avions supposée en tablant sur la valeur expérimentale de la dose  $L+$ .

TOXINE OEDEMATIENS OE9. — D'après nos titrages, la dose  $L+$  de la toxine OE9 est égale à 4,2 mg ; la dose  $L+/4$  est de 1,1 mg (elle est donc voisine de la valeur calculée : 1,05 mg) ; la dose  $L+/10$  est de 0,46 mg (théoriquement elle aurait dû avoir pour valeur 0,42 mg) ; le résultat du titrage en présence du dixième de l'unité antitoxique dépasse donc de 8 p. 100 le résultat du calcul.

Lors de la réalisation de ces titrages, la dose minima mortelle (DMm) de la toxine OE9 était égale à 0,002 mg (poids de toxine provoquant la mort de la moitié des souris injectées par voie sous-cutanée) ; la dose  $L+$  de cette toxine représentait donc 2 100 DMm et la dose  $L+/10$  correspondait à 230 DMm.

TOXINE OEDEMATIENS OE10. — La dose  $L+$  de la toxine OE10 est expérimentalement égale à 5 mg. La dose  $L+/10$  de cette toxine devrait avoir théoriquement pour valeur 0,5 mg ; nos titrages montrent qu'elle est effectivement égale à 0,5 mg. Au moment où ces contrôles sont faits, la DMm de la toxine OE10 est de 0,0038 mg.

TOXINE OEDEMATIENS OE11. — D'après nos récentes déterminations, une unité antitoxique de sérum étalon anti-*œdematiens* neutralise 6,6 mg de la toxine OE11 ; un dixième d'unité en neu-

tralise 0,68 mg (au lieu de 0,66 mg) ; la dose minima mortelle de cette toxine est égale à 0,0066 mg.

Ces observations successives montrent que si la dose L+/10 de deux toxines œdematiens (OE6 et OE9) présente, d'après les titrages, une valeur supérieure à celle que nous avons calculée, dans deux autres cas les résultats des titrages et du calcul concordent : ainsi, 1/10 d'unité internationale anti-œdematiens neutralise dix fois moins de toxine OE10, ou de toxine OE11, qu'une unité antitoxique du même étalon.

#### RÉSULTATS DU TITRAGE DE LA TOXINE SEPTICUM.

L'étalon danois anti-septicum nous a servi à titrer, d'une part, les toxines V5 et V10 préparées avec la souche Feuntun isolée en France, d'autre part, la toxine Vd1 engendrée par la souche danoise 5. Il titre 50 unités anti-septicum par ml ; une unité anti-septicum est donc contenue dans 0,02 ml de cet étalon et 1/4 d'unité dans 0,005 ml. Nous avons recherché les poids de toxine que ces deux doses de sérum sont capables de neutraliser. Nos titrages montrent que :

1° Les doses L+ des toxines V5, V10 et Vd1 sont respectivement égales à 1,9 mg, 2,55 mg et 2,2 mg.

2° Les doses L+/4 des mêmes toxines ont pour valeur 0,55 mg, 0,85 mg et 0,7 mg.

D'après le calcul, 1/4 d'unité antitoxique du même sérum étalon (0,005 ml) aurait seulement dû neutraliser : 0,475 mg de toxine V5, 0,64 mg de toxine V10 et 0,55 mg de toxine Vd1 ; par conséquent, les doses L+/4 expérimentales de trois toxines que nous avons titrées dépassent de 13 à 25 p. 100 les valeurs calculées. Le sérum étalon anti-septicum employé sous le volume de 0,005 ml possède donc expérimentalement une activité antitoxique plus forte que celle que nous avons prévue à la suite des titrages indiquant le pouvoir neutralisant de 0,02 ml de ce sérum.

Le rapport entre les deux volumes de sérum étalon que nous avons utilisés dans nos expériences est égal à 4. D'après les résultats des titrages mentionnés, 0,02 ml de ce sérum ne neutralise pas quatre fois plus de toxine que 0,005 ml. Pour le constater aisément, il suffit de faire le rapport entre le poids de toxine neutralisé par 0,02 ml d'étalon et le poids de la même toxine neutralisé par 0,005 ml de sérum ; on voit que ce rapport est nettement inférieur à 4 ; il est seulement égal à 3,4 dans le cas du titrage de la toxine V5, à 3,15 dans le cas de la toxine Vd1 et à 3 lorsqu'il s'agit de la toxine V10.

Jusqu'à présent, nous avons fait un titrage pour déterminer expérimentalement la dose L+ d'une toxine ; ensuite, nous avons divisé par 4



le résultat obtenu pour connaître le poids de toxine qu'un quart d'unité antitoxique devrait théoriquement neutraliser ; puis, nous avons déterminé par un titrage le poids de toxine que cette faible dose d'antitoxine neutralise effectivement ; enfin, nous avons comparé les résultats théoriques et expérimentaux.

Nous aurions pu procéder autrement, par exemple ainsi : 1° faire un titrage pour déterminer expérimentalement la dose  $L + \frac{1}{4}$  d'une toxine ; 2° multiplier par 4 le résultat du titrage (pour calculer le poids de toxine qu'une unité antitoxique devrait neutraliser) ; 3° déterminer par un titrage le poids de toxine qu'une unité antitoxique neutralise réellement ; 4° comparer les résultats du calcul et du dernier titrage. La conclusion qui découlera de cette comparaison ne s'opposera pas évidemment à celle que nous avons formulée dans les paragraphes précédents ; elle apparaîtra seulement sous une forme différente. Examinons, en effet, les résultats des titrages et des calculs que nous avons faits dans l'ordre que nous venons d'envisager. On voit que 0,005 ml d'étalon (volume employé pour déterminer la dose  $L + \frac{1}{4}$  des toxines *septicum*) neutralise 0,55 mg de la toxine V5, 0,85 de la toxine V10 et 0,7 mg de la toxine Vd1 ; par suite, l'étalon sous le volume de 0,02 ml devrait neutraliser en principe 2,2 mg de la première toxine, 3,4 mg de la deuxième et 2,8 mg de la troisième. En réalité, 0,02 de ce sérum manifeste expérimentalement une activité antitoxique inférieure de 13 à 25 p. 100 à celle indiquée par ce calcul, puisqu'il neutralise seulement, d'après les titrages, 1,9 mg de la première toxine, 2,55 mg de la deuxième et 2,2 mg de la troisième. Pour neutraliser les poids calculés de toxine, il aurait fallu utiliser un volume de sérum nettement supérieur à 0,02 ml.

#### RÉSULTATS DU TITRAGE DE LA TOXINE HISTOLYTICUM.

Nous avons titré, en présence de l'étalon danois anti-*histolyticum*, 4 préparations de toxine *histolyticum* étiquetées H6, H7, H15 et H18. Ce sérum contient 20 unités anti-*histolyticum* par ml, soit une unité dans 0,05 ml et  $\frac{1}{4}$  d'unité dans 0,0125 ml.

Nous avons recherché les valeurs des doses  $L +$  et  $L + \frac{1}{4}$  de chacune des préparations énumérées, c'est-à-dire les poids de toxine qui sont respectivement neutralisés par 0,05 et 0,0125 ml de sérum. Les résultats des titrages sont les suivants :

Toxine H6. . . . .	La dose $L +$ = 1,65 mg	La dose $L + \frac{1}{4}$ = 0,42 mg
Toxine H7. . . . .	La dose $L +$ = 1,45 mg	La dose $L + \frac{1}{4}$ = 0,40 mg
Toxine H15. . . . .	La dose $L +$ = 1,25 mg	La dose $L + \frac{1}{4}$ = 0,43 mg
Toxine H18. . . . .	La dose $L +$ = 0,50 mg	La dose $L + \frac{1}{4}$ = 0,15 mg

Du premier exemple, il ressort qu'un quart d'unité anti-*histolyticum* du sérum étalon reçu de Copenhague neutralise quatre fois moins de toxine H6 qu'une unité antitoxique du même étalon. Dans les autres exemples, nous ne retrouvons pas une telle proportionnalité. En effet, si on divise par 4 la valeur de la dose  $L +$  des toxines H7, H15 et H18 pour calculer le poids de toxine qu'un

quart d'unité antitoxique aurait dû théoriquement neutraliser, on obtient les nombres suivants : 0,36 mg, 0,31 mg et 0,125 mg ; en les comparant à ceux qui ont été déterminés au cours des titrages, 0,40 mg, 0,43 mg et 0,15 mg, on voit que, dans ces 3 cas, un quart d'unité anti-*histolyticum*, c'est-à-dire 0,0125 ml de ce sérum étalon, neutralise appréciablement plus de toxine que ne le faisaient prévoir les calculs que nous avons effectués à la suite des titrages montrant l'activité antitoxique de 0,05 ml de ce sérum.

Ces observations peuvent être présentées autrement que nous venons de le faire : 1° partons du fait expérimental que les doses L+4 des toxines H7, H15 et H18 sont respectivement égales à 0,40, 0,43 et 0,15 mg ; 2° multiplions par 4 ces valeurs numériques pour calculer le poids de toxine qu'une unité anti-*histolyticum* de toxine aurait dû inhiber ; nous obtenons les valeurs : 1,6 mg, 1,72 mg et 0,6 mg ; 3° remarquons que dans nos titrages l'unité anti-*histolyticum* contenue dans 0,05 ml du sérum étalon danois neutralise seulement : 1,45 mg de la toxine H7, 1,25 mg de la toxine H15 et 0,5 mg de la dernière toxine, c'est-à-dire des poids de toxine inférieurs de 9 à 27 p. 100 aux poids calculés. Donc pour obtenir, par exemple, la neutralisation de 0,6 mg de la toxine H18, il aurait fallu utiliser dans les titrages au moins 0,06 ml du sérum étalon contenant 20 unités anti-*histolyticum* par ml (la DMm de cette toxine est de 0,019 mg).

#### RÉSUMÉ.

1° Nous avons comparé les poids de toxine *œdematiens* qui sont respectivement neutralisés par une unité antitoxique de sérum étalon anti-*œdematiens* et par des quantités quatre fois et dix fois plus faibles de cet étalon. Quatre préparations ont été titrées dans les mêmes conditions (titrages sur souris, injections sous-cutanées). Dans 2 cas, une unité anti-*œdematiens* a neutralisé exactement dix fois plus de toxine qu'un dixième de cette unité antitoxique. Dans les 2 autres cas, les poids de toxine neutralisés n'ont pas été rigoureusement proportionnels aux volumes de sérum étalon employés : les résultats du titrage des toxines OE6 et OE9 montrent, en effet, qu'une unité anti-*œdematiens* du sérum étalon neutralise seulement 7,5 à 9 fois plus de toxine qu'un dixième d'unité antitoxique.

2° Trois préparations de toxine *septicum* sont titrées en présence de 0,02 et 0,005 ml de sérum étalon anti-*septicum*. Ces volumes de sérum contiennent respectivement une unité et 1/4 d'unité anti-*septicum*. La première de ces doses de sérum devrait théoriquement neutraliser quatre fois plus de toxine que la deuxième. En réalité une unité anti-*septicum* de l'étalon employé neutralise seulement 3 à 3,4 fois plus de toxine qu'un

quart d'unité anti-septicum (titrages sur souris, voie veineuse).

3° Quatre toxines *histolyticum* sont titrées en présence d'une unité et d'un quart d'unité antitoxique de sérum étalon correspondant. Dans un cas, une unité anti-*histolyticum* neutralise exactement quatre fois plus de toxine qu'un quart d'unité ; dans les 3 autres cas, une unité neutralise seulement 3 à 3,6 fois plus de toxine qu'un quart d'unité anti-histolytique.

#### CONCLUSION.

La comparaison des poids de toxine neutralisés par 2 doses d'immunsérum étalon variant de 4 à 1 montre que la dose la plus forte de sérum n'est généralement pas quatre fois plus antitoxique que la dose la plus faible (titrages sur souris) ; la neutralisation des quantités élevées de toxine exige souvent des volumes de sérum étalon appréciablement plus grands que ceux indiqués par la règle des proportions multiples. Les toxines *œdematiens septicum* et *histolyticum* utilisées au cours de ce travail sont préparées en bouillon Vf et titrées en présence des sérums étalons correspondants indiqués.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY. Ces *Annales*, 1954, **86**, 285.
- [2] M. GUILLAUMIE. Ces *Annales*, 1941, **67**, 112 et 389 ; 1942, **68**, 202.



# ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'INCORPORATION DE LA GLYCINE-1-<sup>14</sup>C, LORS DE LA SYNTHÈSE DES ANTICORPS

par F. GAVOSTO et A. FICQ (\*).

*(Laboratoire de Morphologie animale,  
Université libre de Bruxelles.)*

## INTRODUCTION.

L'étude du lieu où s'effectue la synthèse des anticorps a pris, au cours de ces dernières années, un essor remarquable, en raison surtout des liens qui unissent ce problème à celui, plus général, de la localisation et du mécanisme de la synthèse des protéines.

Les recherches poursuivies jusqu'à présent, en adoptant des conditions expérimentales et des techniques différentes, n'ont pas donné de résultats concordants; de nombreuses hypothèses s'affrontent au sujet de l'identité des organes et des types de cellules responsables de la formation des anticorps.

En particulier, beaucoup de recherches ont été effectuées sur la localisation d'antigènes injectés, après les avoir marqués au préalable par des colorants ou par des isotopes radioactifs [6, 21, 23, 24, 28, 32]. Mais les cellules qui incorporent les antigènes ne sont pas nécessairement celles qui sont responsables de l'élaboration des anticorps. En effet, il n'est pas possible de préciser si ces cellules servent seulement à la fixation et à la digestion préalable de l'antigène, ou si elles réalisent la synthèse définitive de l'anticorps.

Le premier moyen d'investigation qui ait été utilisé pour attaquer la question a été l'observation des modifications morphologiques que subissent des organes variés à la suite de l'introduction de l'antigène; on a, notamment, suivi les relations existant entre l'hyperplasie de certains systèmes cellulaires et le titre en anticorps du plasma, de la lymphe, ou même de suspensions cellulaires [7, 10, 11, 13, 18].

Tout d'abord, on a observé que le siège de la synthèse des

(\*) Manuscrit reçu le 30 octobre 1953.

anticorps dépend principalement du lieu et du mode d'introduction de l'antigène : si on injecte, par exemple, l'antigène directement dans le sang, ce sont surtout les organes en rapport avec le système circulatoire qui présentent des signes de réaction [6, 12, 21, 24, 25, 28]. Si, au contraire, l'administration de l'antigène s'effectue dans des territoires bien définis de l'organisme (intradermique, sous-cutané, péritonéal), les réactions les plus importantes s'observent dans les ganglions satellites [9, 11, 17, 20, 30].

A la suite de ces diverses recherches, la formation des anticorps a été attribuée à différents types de cellules et de nombreuses hypothèses ont été émises.

Deux théories principales s'affrontent : celle, d'une part, qui voit dans la *cellule lymphocytaire* le siège principal de la formation des anticorps [19], et celle qui attribue cette fonction aux *cellules du système réticulo-endothélial* [1, 12].

Ces deux conceptions se basent principalement sur des observations décrivant une hyperplasie soit réticulo-endothéliale, soit lymphocytaire, dans les organes d'animaux qui ont reçu de différentes façons des antigènes.

Il importe, cependant, de préciser que cette alternative, telle que nous venons de la présenter, est par trop schématique : certains auteurs ne manquent pas de faire des réserves et de manifester des tendances conciliatrices.

White [33], par exemple, admet que les lymphocytes pourraient ne représenter qu'un lieu de dépôt des anticorps, qui pourraient être synthétisés ailleurs : récemment, Ringertz et al. [27] ont admis que les plasmacytes pourraient dériver de lymphoblastes qui, une fois stimulés par l'antigène, évolueraient en plasmacytes producteurs d'anticorps, plutôt qu'en lymphocytes.

Pendant ces dernières années, tous ces problèmes ont été abordés sous différents angles, au moyen de procédés techniques de plus en plus raffinés ; des résultats assez convaincants, sinon probants, ont été apportés en faveur de l'une et de l'autre de ces hypothèses.

En recueillant le matériel issu du canal lymphatique efférant du ganglion et en le centrifugeant, Harris et ses collaborateurs [19] ont, notamment, pu démontrer l'existence d'un titre beaucoup plus élevé en anticorps dans les lymphocytes isolés que dans la lymphocyte elle-même.

D'autre part, Fagraeus [12, 13] a observé, *in vitro*, que la capacité de la pulpe rouge de la rate à former des anticorps est nettement supérieure à celle des follicules lymphocytaires ; or les fragments de pulpe rouge qui se montrent si actifs sont aussi particulièrement riches en plasmacytes.

On voit que l'élaboration de l'anticorps dans les différents

types de cellules étudiés n'a pu être que déduite et qu'elle n'a jamais été démontrée directement.

Pour résoudre le problème de façon définitive, il faudrait pouvoir suivre, non seulement la fixation de l'antigène par la cellule, mais encore sa digestion et le sort des produits de son métabolisme, en particulier celui du « groupe déterminant » qui agirait comme « modèle » dans la synthèse des anticorps.

Malheureusement, de sérieuses difficultés techniques et théoriques ne permettent pas encore d'aborder ce problème aussi directement.

Une voie détournée et moins ambitieuse consiste à centrer les recherches sur la synthèse protéique dans les différentes zones de l'organe où les anticorps sont produits.

C'est dans ce sens que nous avons conduit les expériences qui font l'objet de ce travail : elles ont consisté à étudier, par la méthode autoradiographique, l'incorporation de la glycine-1-<sup>14</sup>C, lors de la synthèse des anticorps, dans le ganglion lymphatique du rat.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Des rats de 150 g environ ont été choisis comme matériel expérimental. Nous avons utilisé comme antigène du vaccin mixte TABC préparé par l'Institut Pasteur. Les animaux ont été d'abord sensibilisés par l'injection sous-cutanée de 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspension bactérienne. Après douze à quatorze jours, 2 cm<sup>3</sup> de la suspension bactérienne ont été centrifugés et le culot a été remis en suspension dans 0,4 cm<sup>3</sup> du surnageant, de façon à concentrer environ cinq fois les bacilles.

L'injection a été faite, par voie intradermique dans la plante de la patte postérieure, à mi-chemin entre les orteils et le talon du rat.

Trois animaux ainsi traités ont été sacrifiés, respectivement cinq, huit et douze jours après l'injection.

Comme contrôle de l'activité antigénique de la suspension bactérienne employée, nous avons titré le sérum prélevé lors d'une expérience : nous avons constaté, après huit jours, une activité au 1/400.

Vingt-quatre heures avant de tuer l'animal, une quantité de glycine-1-<sup>14</sup>C correspondant à la radioactivité de 5  $\mu$ curies a été injectée par voie intraveineuse.

Deux autres rats ont été utilisés comme témoins : ils ont été injectés de la même quantité de glycine marquée et sacrifiés après vingt-quatre heures ; nous avons préféré utiliser ce moyen de contrôle, plutôt que de prélever, aux animaux traités, d'autres ganglions où se manifestent parfois des réactions collatérales.

On sait que tous les vaisseaux lymphatiques du pied sont tribu-

liaires du seul ganglion poplité ; celui-ci est facilement localisable dans le creux poplité, après incision de la mince paroi musculaire et il est aisé de l'enlever. C'est sur ces ganglions poplités que toutes nos études ont porté ; une fois excisés, ils ont été fixés dans l'alcool-acétique (3:1). Les opérations de la technique histologique et autoradiographique ont été effectuées suivant les modalités exposées dans un travail antérieur [15]. La durée de l'exposition en chambre noire, dans le cas présent, a été de trois jours après le séchage.

#### RÉSULTATS.

1° Les ganglions poplités satellites des animaux injectés d'antigène manifestent une augmentation de volume (environ 1,5 par rapport aux ganglions des témoins) ; cette augmentation était particulièrement frappante dans le cas de l'animal sacrifié après huit jours.

2° La structure microscopique des ganglions satellites est considérablement altérée. Chez l'animal sacrifié après cinq jours, on note d'intenses phénomènes de prolifération, tant dans le tissu médullaire que dans la région corticale.

Dans la portion médullaire, on reconnaît, à côté d'éléments lymphocytaires plus ou moins mûrs, de nombreuses cellules réticulaires jeunes, pourvues d'un grand noyau ovoïde ou réniforme. Certaines de ces cellules ne possèdent qu'un cytoplasme ténu, non colorable à la pyronine ; mais la majorité d'entre elles présentent une évidente basophilie (*cellules réticulaires stimulées* de Gullino [16]).

En outre, on rencontre çà et là, des éléments plasmatoctaires plus ou moins mûrs. On observe également une certaine prolifération des cellules endothéliales de la paroi du sinus ; des cellules d'aspect histiocyttaire (macrophages) se rencontrent dans la lumière des sinus. Notons enfin la présence de rares leucocytes dans la pulpe et dans la lumière des sinus. Les follicules lymphocytaires montrent un centre clair très développé, entouré d'un manteau lymphocytaire, parfois très étroit et dense. Le centre est constitué d'un agglomérat de cellules jeunes, à cytoplasme basophile : la plupart d'entre elles ont l'aspect de cellules réticulaires stimulées ; d'autres se rapprochent des lymphoblastes, tandis qu'on rencontre quelques lymphocytes. On ne trouve, par contre, pas de plasmatoctes mûrs.

De nombreuses mitoses sont visibles. Aucun signe de dégénérescence ne se remarque dans les éléments cellulaires.

Chez l'animal sacrifié après huit jours, le ganglion présente un aspect un peu différent : le nombre des cellules réticulaires à cytoplasme basophile est toujours plus élevé dans la région médullaire ; le pourcentage de plasmatoctes mûrs s'est accru.



On observe, de plus, une intense prolifération des cellules pariétales dans la lumière des sinus ; un grand nombre de cellules desquamées forment un syncytium, tandis que d'autres, isolées, ont un aspect histiocytaire. D'autres cellules encore manifestent des caractéristiques plasmatoctaires.

Le tissu cortical révèle un certain degré d'hyperplasie lymphocytaire et la présence, parmi la masse de lymphocytes, de quelques plasmatoctes.

Dans le centre clair, toujours très développé, on observe en

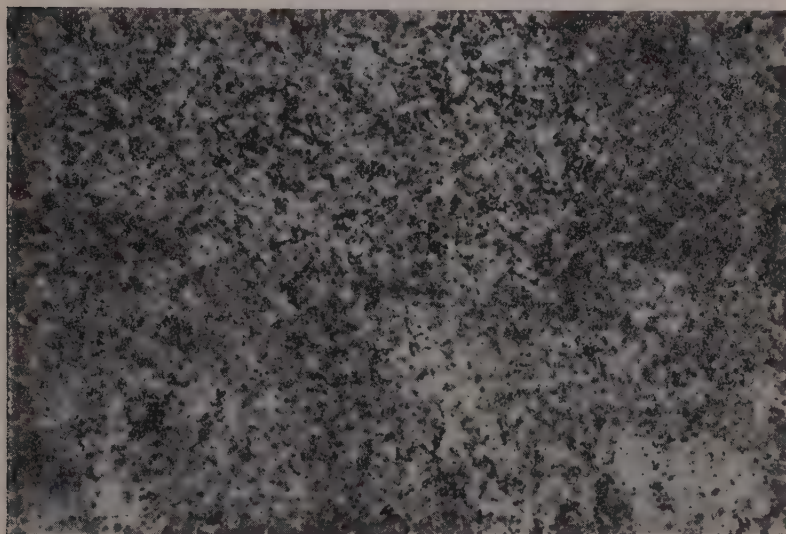


FIG. 1. — Centre clair d'un follicule hyperplasique et très actif.  
On voit le manteau lymphocytaire étroit beaucoup moins actif.

outre beaucoup d'éléments réticulaires à cytoplasme basophile ; on y note la présence de quelques mitoses et celle d'éléments du type lymphoblastique, qu'il est parfois difficile de classer.

Chez l'animal sacrifié après douze jours, on note, surtout dans les éléments des centres clairs, l'apparition de phénomènes de dégénérescence (pynoses nucléaires et caryolyses), ainsi qu'une augmentation du nombre des leucocytes.

Dans ce cas, on observe également une diminution du nombre des cellules réticulaires jeunes, tandis que celui des plasmatoctes demeure à peu près constant.

3° Passons maintenant à l'examen des *plaques nucléaires* : il montre, dans les ganglions satellites des animaux traités, une nette différence de radioactivité entre la zone médullaire et la zone corticale (dans le rapport de 5 :1).

Les centres clairs des follicules présentent une activité élevée, semblable à celle de la zone médullaire : il en résulte un contraste très marqué entre le centre clair et le manteau lymphocytaire, du point de vue de la radioactivité (fig. 1).

La localisation des traces particulières provenant des différents types de cellules ne peut pas toujours être définie avec précision, soit parce que les traces sont incomplètes, soit parce qu'elles apparaissent sur un autre plan, à cause de la perte des grains d'origine, soit encore, parce que leur origine est située à la limite de deux ou de plusieurs cellules.

Dans certains cas, l'origine de la trajectoire n'est visiblement



FIG. 2. — Deux traces issues d'une jeune cellule endothéliale se desquamant de la paroi du sinus lymphatique.

pas en rapport avec les cellules : il s'agit probablement de glycine liée aux protéines des liquides extracellulaires. Toutefois, on peut reconnaître facilement que la majorité des traces provient des cellules réticulaires basophiles, des cellules pariétales des sinus (fig. 2) et des jeunes éléments basophiles des centres folliculaires.

Les plasmacytes, également, présentent une activité discrète, à peu près du même ordre de grandeur que celle des cellules réticulaires jeunes. L'activité des lymphocytes est nettement moindre : les leucocytes ne sont pas actifs. Parfois on peut localiser l'origine de la trajectoire dans le noyau, parfois dans le cytoplasme.

Dans les préparations obtenues avec l'animal tué huit jours après l'expérience, la répartition de la radioactivité dans le ganglion satellite ne change pratiquement pas par rapport au cas précédent (fig. 3, 4, 5).

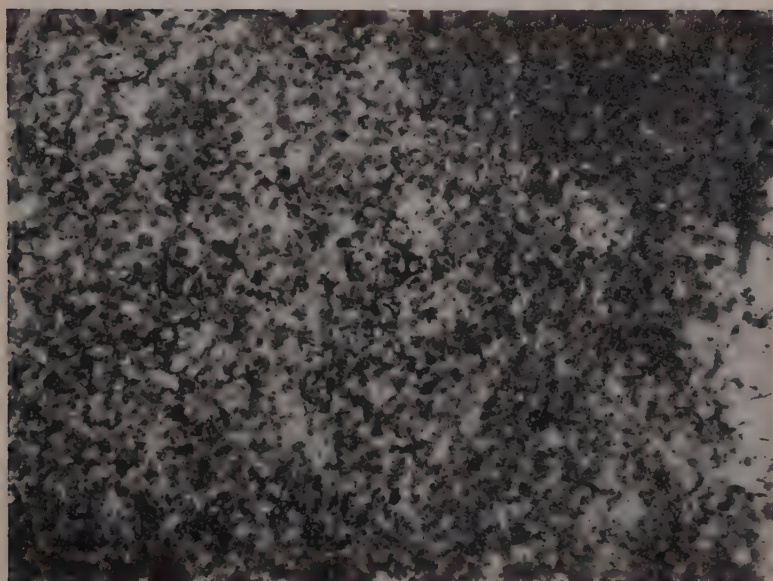


FIG. 3. — Follicule lymphocytaire : on aperçoit la nette différence d'activité entre le centre clair hyperplasique et le manteau lymphocytaire.

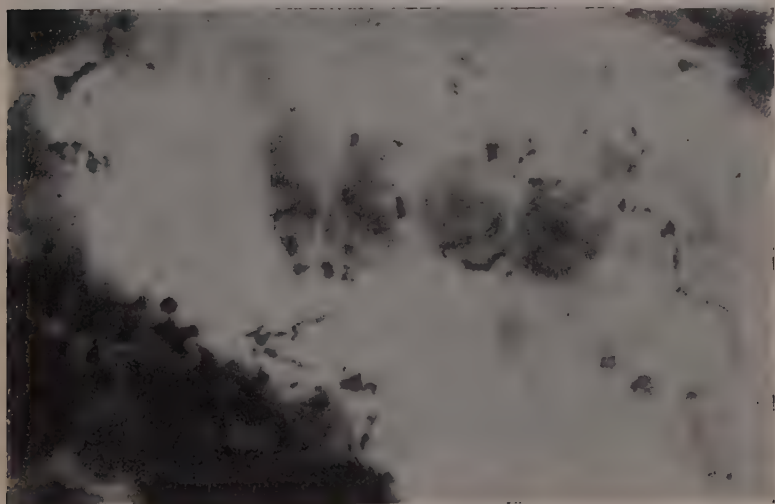


FIG. 4. — Desquamation dans la lumière du sinus de cellules, dont plusieurs basophiles, actives.

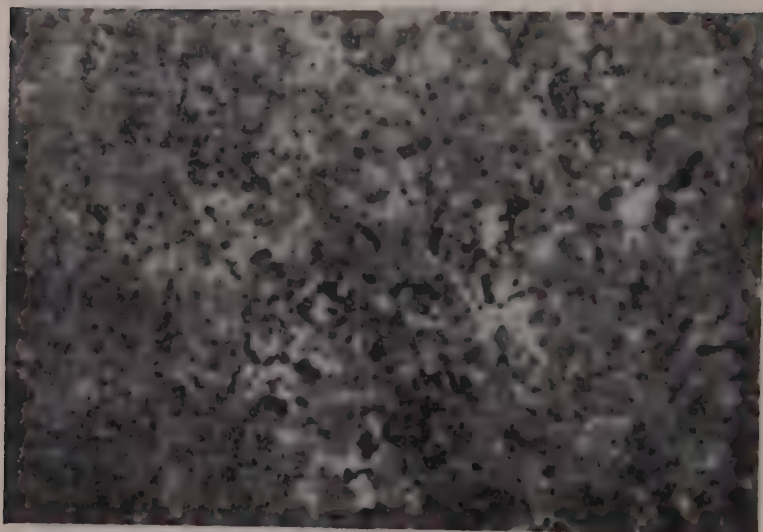


FIG. 5. — Région médullaire d'un ganglion (animal sacrifié après 8 jours).

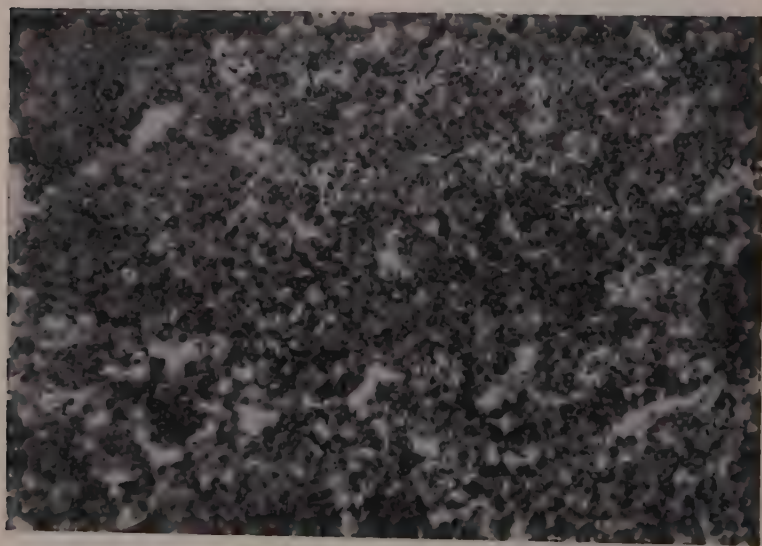


FIG. 6. — Follicule lymphocytaire du rat témoin.



Les plasmacytes mûrs, plus nombreux maintenant, présentent une activité à peu près égale à celle des cellules réticulaires les plus jeunes.

L'activité totale et les variations d'activité entre les différentes zones diminuent considérablement chez le troisième animal (douze jours après l'injection) ; c'est particulièrement le cas des centres folliculaires, qui présentent, comme on l'a déjà dit, des signes de dégénérescence à ce moment.

4° Les préparations des animaux témoins ont une allure nettement différente : la radioactivité totale y est sensiblement moindre ; celle des centres clairs est faible : elle est comparable à celle du tissu lymphocytaire qui représente la grande masse du follicule (fig. 6).

En outre, nous avons l'impression que, dans les préparations-contrôles, la majeure partie des traces est issue des noyaux cellulaires ; mais dans les autres cas, la prédominance des cellules à cytoplasme peu abondant, les lymphocytes et les cellules réticulaires notamment, ne doit pas être perdue de vue.

#### DISCUSSION.

Après l'administration de l'antigène, on observe une prolifération précoce des éléments réticulo-endothéliaux du ganglion. Les cellules réticulaires stimulées montrent une affinité marquée pour les colorants basiques (pyronine).

L'apparition d'une telle basophilie peut être interprétée comme l'expression d'un accroissement de la synthèse protéique : on connaît, en effet, les rapports existant entre la présence d'acide ribonucléique en grande quantité et la synthèse des protéines (Brachet [2], Caspersson [4]).

L'augmentation des synthèses protéiques est démontrée par nos expériences, qui établissent que l'incorporation de la glycine est plus élevée dans ces cellules basophiles.

Cette incorporation, compte tenu de l'imperfection de la méthode qui n'est pas encore assez sélective, semble avoir lieu tant dans le cytoplasme que dans le noyau.

Ceci concorde bien avec les résultats obtenus par d'autres méthodes et sur d'autres matériels, par Mirsky [8] et par Smellie, Mc Indoe et Davidson [29].

En ce qui concerne le noyau, il n'est pas possible de préciser s'il y a une incorporation préférentielle de la glycine au niveau du nucléole qui, selon certaines théories (Caspersson [5], Thorrell [31]), serait, comme le cytoplasme, le siège d'une synthèse protéique.

De nombreuses cellules réticulaires stimulées évoluent dans le sens plasmacytaire ; durant la maturation des plasmacytes, on

observe également un accroissement de la basophilie cytoplasmique ; il s'agit sans doute là d'une persistance, sinon d'une augmentation, des processus de synthèse protéique.

Dans nos préparations, les plasmotocytes présentent, eux aussi, une activité élevée. Mais ni leur augmentation numérique, ni leur activité ne sont assez importantes pour faire penser que les anticorps soient élaborés exclusivement dans les éléments de ce type.

On sait que l'élaboration des anticorps consiste en une synthèse de protéines, en particulier de  $\gamma$ -globulines, semblables à celles du plasma normal. La seule différence existant avec ces dernières réside dans la faculté qu'ont les anticorps de se combiner spécifiquement avec l'antigène, probablement parce que la configuration moléculaire de l'anticorps est complémentaire de celle du groupe déterminant qui caractérise l'antigène.

Ce dernier pourrait intervenir comme un modèle dans le mécanisme synthétique de l'anticorps lui-même (Haurowitz [22]), où il pourrait déterminer une modification du système enzymatique présidant à la synthèse de l'anticorps (Burnet [3]).

La production de l'anticorps débute peu de temps après l'introduction de l'antigène. On a pu démontrer avec certitude, au moyen d'antigènes marqués, que ces derniers sont incorporés principalement dans les cellules appartenant au S. R. E. ; l'incorporation préférentielle dans les divers organes dépend, on s'en souvient, du mode et du lieu de l'administration.

Gavosto et Ficq [14, 15], notamment, ont constaté, par la technique autoradiographique, qu'un antigène radioactif, le virus de la mosaïque du tabac, se fixe en majeure partie dans les cellules réticulo-endothéliales et dans les cellules hépatiques.

Chez les animaux sacrifiés les huitième et quinzième jours après l'introduction de l'antigène marqué, ces auteurs ont pu démontrer la présence de l'antigène, en quantité réduite, dans les mêmes types de cellules : il est donc vraisemblable que les processus qui font suite à la simple fixation de l'antigène se déroulent au sein des cellules mêmes où l'antigène s'est fixé.

De son côté, Fagraeus [12] a démontré que les cellules réticulaires de la rate, en particulier les plasmotocytes, produisent des anticorps, même *in vitro*.

Ces exemples, ainsi que de nombreux autres, plaident en faveur de l'hypothèse suivant laquelle les cellules réticulo-endothéliales seraient responsables de plus qu'une simple incorporation de l'antigène. Le présent travail établit précisément que ces cellules sont le siège d'un intense métabolisme protéique ; l'hypothèse que l'élaboration des anticorps se ferait dans les cellules réticulo-endothéliales, principalement sinon exclusivement, se voit donc renforcée.

Une activité qui est toujours plus faible, a été trouvée, dans nos préparations, au niveau des cellules du type lymphocytaire *sensu strictiori*.

Dans leur cas, on note que l'activité maxima semble bien se manifester dans les lymphocytes jeunes (lymphoblastes) des centres folliculaires ; il est d'ailleurs difficile de distinguer, dans nos préparations, ces cellules des éléments réticulaires jeunes.

D'autre part, spécialement dans le cas des animaux sacrifiés après huit et douze jours, il apparaît des signes de prolifération lymphocytaire. Le fait qu'un certain degré d'hyperplasie succède à l'intense réaction réticulo-endothéliale nous fait croire à une participation plutôt tardive de la lignée lymphocytaire.

Il se pourrait donc fort bien que celle-ci ne joue pas de rôle prédominant dans l'élaboration de l'anticorps, mais qu'elle participe plutôt aux phénomènes qui président au transfert et à la mise en circulation de celui-ci.

En effet, les lymphocytes du canal efférent du ganglion sont très riches en anticorps (Harris) qu'ils peuvent libérer rapidement sous l'action de diverses stimulations endogènes ou exogènes (White et Dougherty [34]).

De toutes ces observations, il résulte qu'une conception nettement dualiste de la genèse des anticorps dans les plasmacytes ou dans les lymphocytes apparaît comme dépassée : en effet, l'élément cytologique dominant dans le tissu ganglionnaire en train de réagir à la stimulation antigénique est une cellule réticulaire jeune. Celle-ci ne diffère de la cellule réticulaire au repos que par sa forte basophilie cytoplasmique, expression d'un intense métabolisme protéique ; c'est pourquoi ce type de cellule a été appelé par certains auteurs italiens (Mottura [26], Gullino [16]) : cellule réticulaire activée.

Si l'on accepte le concept de la totipotence de la cellule réticulaire primitive, on doit admettre que le lymphocyte, tout comme le plasmacyte, en dérivent. Il se peut que les processus de synthèse des anticorps continuent dans ce dernier, même pendant sa maturation : il se caractérise, en effet, par la persistance d'une forte basophilie et l'incorporation massive de la glycine radioactive ; le lymphocyte ne ferait que conserver les anticorps déjà formés et il interviendrait dans leur transport et leur mise en réserve.

#### RÉSUMÉ.

L'incorporation de la glycine-1-<sup>14</sup>C, lors de la synthèse des anticorps, a été étudiée dans les ganglions lymphatiques du rat, par la méthode autoradiographique.

Des rats, préalablement sensibilisés, ont été injectés de

vaccin TABC dans la patte postérieure et sacrifiés à des intervalles de temps différents.

Vingt-quatre heures avant la mort, il a été procédé à l'injection intraveineuse d'une quantité de glycine-1-<sup>14</sup>C dont la radio-activité globale était de 5  $\mu$  curies.

Deux rats, utilisés comme témoins, ont été injectés de la même quantité de glycine et tués vingt-quatre heures après.

On a pu observer, dans les ganglions satellites, une hyperplasie des cellules réticulaires indifférenciées et basophiles (plasmablastes, plasmocytes), notamment dans la région médullaire et dans les centres clairs des follicules lymphocytaires.

L'incorporation de l'acide aminé marqué dans ces cellules semble se produire tant dans le noyau que dans le cytoplasme. Elle est beaucoup moindre dans les lymphocytes, quel que soit leur degré de maturité.

★ ★

Nous remercions vivement le professeur Occhialini pour les conseils techniques qu'il nous a donnés, et le Dr Beumer pour nous avoir procuré le vaccin TABC.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BING et N. CHRISTENSEN. *Acta med. scand.*, 1944, **116**, 382.
- [2] J. BRACHET. *Enzymologia*, 1941, **10**, 87.
- [3] F. BURNET et F. FENNER. *The production of antibodies*, 1949. Melbourne.
- [4] T. CASPERSSON. *Naturwiss.*, 1941, **28**, 33.
- [5] T. CASPERSSON. *Cell growth and cell function*. Norton, New-York, 1950.
- [6] A. H. COONS, E. H. LEDUC et M. H. KAPLAN. *J. exp. Med.*, 1951, **95**, 173.
- [7] C. G. CRADDOCK et J. S. LAWRENCE. *J. Immunol.*, 1948, **60**, 241.
- [8] M. DALY, V. ALLFREY et A. MIRSKY. *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 173.
- [9] W. E. EHRLICH, T. N. HARRIS et E. MERTENS. *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 373.
- [10] W. E. EHRLICH, D. L. DRABKIN et C. FORMAN. *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 157.
- [11] W. E. EHRLICH et T. N. HARRIS. *J. exp. Med.*, 1942, **76**, 335.
- [12] A. FAGRAEUS. *Acta med. scand.*, 1948, **130**, suppl., 204.
- [13] A. FAGRAEUS. *J. Immunol.*, 1948, **58**, 1.
- [14] F. GAVOSTO et A. FICQ. *Nature*, 1953, **172**, 406.
- [15] F. GAVOSTO et A. FICQ. *Ces Annales* (sous presse).
- [16] P. GULLINO. *Rec. Progr. in Med.*, 1951, **11**, 288.
- [17] P. GULLINO. *Arch. Sci. med.*, 1950, **90**, 67.
- [18] T. N. HARRIS et W. E. EHRLICH. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 157.
- [19] T. N. HARRIS, E. GRIMM, E. MERTENS et W. E. EHRLICH. *J. exp. Med.*, 1945, **81**, 73.
- [20] T. N. HARRIS et S. HARRIS. *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 169



- [21] F. HAUROWITZ, C. F. CRAMPTON et R. SOWIŃSKI. *Feder. Proceed.*, 1951, **10**, 560.
- [22] F. HAUROWITZ. *Biol. Rev.*, 1952, **27**, 247.
- [23] H. KRUSE et P. D. MAC MASTER. *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 425.
- [24] L. LIBBY et C. R. MADISON. *J. Immunol.*, 1947, **55**, 15.
- [25] P. D. MAC MASTER et H. KRUSE. *Feder. Proceed.*, 1951, **10**, 564.
- [26] G. MOTTURA. *Rec. Progr. in Med.*, 1951, **11**, 266.
- [27] N. RINGERTZ et C. A. ADAMSON. *Acta pathol. microbiol. scand.*, 1950, suppl., 86.
- [28] F. R. SABIN. *J. exp. Med.*, 1939, **70**, 67.
- [29] R. SMELLIE, W. MC INDIE et J. N. DAVIDSON. *Biochim. biophys. Acta*, 1953, **11**, 559.
- [30] R. SMITH et W. B. WOOD. *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 555.
- [31] B. THORELL. *Cold Spring Harbor Sympos.*, 1947, **12**, 247.
- [32] S. WARREN et F. DIXON. *Amer. J. med. Sci.*, 1948, **216**, 136.
- [33] A. WHITE. *Ann. Rev. Phys.*, 1949, **11**, 355.
- [34] A. WHITE et T. DOUGHERTY. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1946, **46**, 859.

# RECHERCHES SUR L'EFFET TOXIQUE DE *BACILLUS CEREUS* var. *ALESTI* VIS-A-VIS DES VERS A SOIE

(DEUXIÈME PARTIE)

par G. TOUMANOFF, C. VAGO et C. GLADILINE (\*).

(Institut Pasteur de Paris  
et Station de Recherches Séricicoles d'Alès, I. N. R. A.)

Dans une publication antérieure [6] a été relatée une première série d'observations visant à connaître les origines de l'action toxique sur les vers à soie de *Bacillus cereus* var. *alesti*, agent pathogène [8, 3] d'une flacherie infectieuse compromettant les élevages de cet insecte.

Nous avons rapporté ainsi, la contamination *per os* des chenilles de *Bombyx mori* L. par les cultures chauffées, le filtrat des colonies et du milieu de culture, l'effet du culot et du liquide surnageant des cultures centrifugées, de cultures entièrement sporulées, et enfin l'action de cultures autoclavées.

Nous avons commencé par ces procédés simples, indispensables à appliquer lorsqu'on opère avec un germe récemment mis en évidence et agissant sur les insectes d'une manière si spéciale.

Ces recherches ont démontré la ténacité avec laquelle la substance toxique est fixée sur les corps bactériens et, par conséquent, la difficulté de la libérer.

Aussi avons-nous poursuivi la deuxième série de nos travaux en expérimentant d'autres procédés de libération de la substance toxique.

Nous avons étudié l'effet *per os* ou par injection dans la cavité générale des filtrats sur bougies de suspensions bactériennes, celui des cultures sur bouillon jeunes et âgées et des cultures congelées et décongelées; enfin, des suspensions de colonies ultrasonnées et de leur filtrats.

Ces expériences nous ont incités à continuer par l'étude d'une

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 décembre 1953.

lécithinase extraite de *Bacillus cereus* var. *alesti* et d'un autre bacille pathogène pour les Lépidoptères.

## I. — FILTRATS DES CULTURES SUR BOUILLON.

De nombreux essais d'administration aux vers jeunes ou âgés, de filtrats de cultures de vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures sur bouillon, ont montré le faible effet de ces derniers *per os*, et les vers du cinquième stade nourris de feuilles trempées dans les filtrats ont toujours filé leur cocon. Par contre, les résultats souvent positifs des injections de filtrats montrent la présence d'un effet toxique. Voici à titre d'exemple quelques expériences :

a) Douze vers au cinquième âge sont injectés avec un filtrat de culture de vingt-quatre heures sur bouillon le 21 mai 1953, à 16 h. 55. Le 22 mai 1953, il y a trois morts et un mourant. Le sang est stérile.

Le 25 mai 1953, deux morts ; le 28 mai 1953, un malade. Tous les autres font leur cocon.

b) Dix vers au cinquième âge reçoivent 10 divisions (1) du filtrat d'une culture de soixante-douze heures le 21 mai 1953, à 17 heures. Trois meurent entre le 22 et le 25. Les autres se transforment en chrysalide, dont deux avec cocon.

c) Dix vers au cinquième âge reçoivent chacun 10 divisions du filtrat d'une culture de vingt-quatre heures le 21 mai 1953, à 17 h. 15. Le 22 mai 1953, à 15 heures, deux sont morts ; absence de germes dans le sang, quelques streptocoques dans l'intestin. Le 26 mai 1953, un ver meurt. Le 30 mai 1953, un autre meurt dans le cocon, mais les autres se transforment en chrysalides.

## II. — FILTRATS DE SUSPENSIONS CONGELÉES ET DÉCONGELÉES.

L'administration *per os* de cultures de quarante-huit heures congelées et décongelées six fois, puis filtrées sur bougie L3, n'a pas provoqué de mortalité, mais, et ceci surtout dans le cas de vers jeunes, un très fort retard dans l'évolution (2).

(1) Une division de 1 cm<sup>3</sup>, tracée sur les pipettes Pasteur étirées sous contrôle, correspond environ à 1/200 de centimètre cube. Les vers au cinquième âge supportent bien l'injection de 10 divisions de liquide et même davantage. Cette quantité, n'exerçant pratiquement pas d'effet mécanique sur les vers et n'occasionnant pas de choc, a été adoptée comme dose maxima.

(2) Il s'agissait de suspensions de cultures de *B. cereus* var. *alesti* en boîtes de Roux. Les suspensions utilisées furent d'une boîte de Roux pour 100 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Les congélations et décongélations ont été faites au Service de M. Jacotot par Mr. Le Priol à qui nous tenons à exprimer nos remerciements.

L'injection de ces filtrats n'a pas permis de relever d'effet toxique appréciable. Voici quelques-unes de nos expériences :

*Administration per os.*

a) Deux lots de 10 vers au troisième âge sont nourris de feuilles trempées dans la culture de *B. cereus* var. *alesti* de quarante-huit heures six fois congelée et décongelée, filtrée sur L3 (le 25 mars 1953).

Le premier repas est donné le 6 mai 1953, à dix-huit heures. Les vers reçoivent le même repas quatre fois par jour pendant les journées qui suivent.

Le 20 mai, tous les vers sont vivants, mais restent au troisième âge. Ils font leurs mues du 23 mai au 25 mai.

Le 30 mai, ces vers sont infectés d'une culture virulente de *B. cereus* var. *alesti* et meurent tous le lendemain.

*Injection dans la cavité générale.*

b) Quatre vers sont inoculés le 30 avril 1953 avec 10 divisions d'une suspension de culture congelée et décongelée à six reprises. Les vers deviennent « courts » ou filent des cocons irréguliers.

c) Trente vers reçoivent chacun 5 divisions du filtrat des cultures congelées et décongelées. Le 16 mai 1953 nous constatons que six vers sont raccourcis, les autres étant normaux. Aucune mortalité.

### III. — SUSPENSIONS DE CULTURES ULTRASONNÉES (3).

Les suspensions des colonies sur gélose, ultrasonnées pendant des durées diverses, conservées avant leur emploi pendant quelques semaines au frigidaire et non filtrées, se sont avérées virulentes *per os*, mais beaucoup moins que les suspensions normales de cultures à concentration égale et même inférieure, et leur action se manifeste d'une manière tout à fait différente. Par exemple :

a) Vingt vers au troisième âge reçoivent, le 6 mai 1953, des feuilles humectées d'une suspension de culture ultrasonnée 3 heures, le 30 avril 1953 et conservées au froid. Les vers n'acceptent cette suspension qu'après dilution avec 6 parties d'eau. Le 10 mai 1953, 1 mort, le 11 mai 1953, 3 morts, exempts de bacilles dans le sang, le 12 mai 1953, 2 sont mourants. Du 13 mai 1953 au 17 mai 1953, 14 morts avec sang stérile.

Cinq vers sont broyés pour l'infection de vers sains. Ces derniers restent vivants jusqu'au 29 juin 1953. Ainsi, l'infection n'a pas été transmise par les cadavres. Les vers soumis ultérieurement à l'infection par une culture virulente moururent le lendemain.

b) Parmi vingt vers du même âge que les précédents, infectés dans les mêmes conditions, la mortalité commence à se manifester également

(3) Les suspensions ont été ultrasonnées au laboratoire de M. Prudhomme à l'Institut Pasteur de Paris (Service de M. Grabar), par ses soins, et avec l'aide de son collaborateur M. Claude Grandchamp. Nous tenons à leur exprimer ici notre vive reconnaissance.



le 11 mai 1953. Dix-huit vers meurent jusqu'au 20 mai 1953. Dans les deux lots *a* et *b* les vers restent petits et ne mesurent que 2,5 cm. Dans les lots témoins les vers passent au quatrième stade.

L'injection d'une culture ayant subi l'effet des ultrasons pendant trois heures exerce, même à faibles doses, un effet très prononcé sur les vers puisqu'elle provoque une septicémie constante et mortelle.

*a*) Vingt vers (cinquième âge) reçoivent par injection une division de pipette Pasteur d'une culture ultrasonnée le 12 mai 1953, à 11 h. 50. Le lendemain à 15 h. 30, un ver est mort et quatre sont mourants. On observe une septicémie aussi bien chez les premiers que chez les seconds. Tous meurent avant le 14 mai 1953, à 17 h. 40, avec les mêmes symptômes.

#### IV. — FILTRATS DES CULTURES ULTRASONNÉES.

Les suspensions de la série précédente se sont montrées, après filtration à travers des bougies L3, dépourvues de toxicité aussi bien *per os* que par injection dans la cavité générale.

Dans l'interprétation du phénomène, il faut tenir compte avant tout de la complexité du procédé de filtration. L'absence de toxicité (d'après l'avis de notre collègue M. Grabar, chef du Service de Chimie microbienne à l'Institut Pasteur) pourrait être expliquée par la rétention de la toxine sur les débris cellulaires, ou bien par le fait qu'elle est engagée dans le complexe volumineux absorbé par la bougie.

Quoique l'action des ultrasons ait été réalisée sans précautions spéciales en vue d'éviter leur effet oxydant, la substance toxique n'a pas été complètement détruite, puisque l'intoxication des vers a eu lieu avec les suspensions ultrasonnées non filtrées.

Nous nous dispensons de citer les expériences qui furent toutes négatives.

#### V. — LÉCITHINASE EXTRAITE DES CULTURES.

En décrivant diverses souches de *B. cereus* entomophytes, l'un de nous a constaté que toutes ces souches, à en juger par leur effet sur le jaune d'œuf, produisent de la lécithinase. Il a émis l'hypothèse que cette lécithinase pouvait exercer un effet toxique sur les insectes [6].

Nous avons donc cherché à extraire une lécithinase de *B. cereus* var. *alesti* et à éprouver son effet sur les vers. La méthode est celle utilisée par Chu [4] pour l'obtention d'enzyme à partir de cultures sur bouillon. La source d'enzyme était une culture de vingt heures sur bouillon. Au filtrat de la culture, qui contient généralement une à deux unités de lécithinase, est ajouté dou-

cement du sulfate d'ammonium pour obtenir une saturation aux deux tiers. Le précipité qui contient le maximum d'enzyme (4) est redissous dans une quantité d'eau égale à 1/20 de son volume original. Cette solution est complétée d'une solution saturée de sulfate d'ammonium égale à la moitié de son volume, pour obtenir par centrifugation un précipité brun foncé gluant. La partie surnageante est dialysée pendant huit heures par de



FIG. 1.



FIG. 2.

FIG. 1 et 2. — Aspect des vers à soie morts à la suite de l'injection dans la cavité générale de la lécithinase extraite de *Bacillus cereus* var. *alesti*; on remarque l'état flat des vers caractérisant la flacherie infectieuse.

l'eau courante et ensuite par de l'eau distillée à 2°, que l'on change plusieurs fois.

Le dialysat est filtré sur bougie L3, puis il est, soit injecté aux vers, soit administré à ceux-ci *per os* dilué dans l'eau à raison de 2 parties de filtrat pour 8 parties d'eau, en trempant les feuilles dans cette solution.

L'injection de la suspension de lécithinase cause toujours une

(4) Comme l'avait montré Colmer [2] pour les souches d'autres origines.

mortalité importante atteignant souvent 100 p. 100. L'évolution de la maladie, les symptômes de paralysie et l'état flasque des vers sont semblables à ceux de l'infection naturelle à *B. cereus* var. *alesti*. L'examen du sang des vers malades et des vers morts, aussitôt après la mort, nous a montré l'absence de bactéries. La mortalité doit donc être attribuée à l'effet toxique de l'enzyme. Par exemple :

a) Trente vers reçoivent par injection le 15 mai 1953, à 11 h. 25, 5 divisions (environ  $1/40$  de  $\text{cm}^3$ ) de lécithinase (préparée le 29 mars



FIG. 3. — Ver mort ayant reçu la lécithinase *per os*.

1953) et présente un choc après injection, puis reprennent leur aspect normal pour redevenir affaiblis au bout de vingt-quatre heures. Le 16 mai 1953 et le 17 mai 1953 plusieurs malades : mouvements lents et paralysie. Le 18 mai 1953, huit vers sont morts flasques. Du 18 au 24, huit autres vers meurent. Encore neuf morts du 24 au 30 mai 1953 et cinq sont transformés en chrysalides.

b) Trente vers reçoivent 10 ( $1/20$  de  $\text{cm}^3$ ) divisions de lécithinase le 20 mai 1953, à dix-huit heures. Les vers restent immobiles jusqu'à 19 h. 30. Le 21 mai 1953, dix-neuf sont morts, tous les autres fortement malades. Le 26 mai 1953, tous sont morts.

c) Dans d'autres essais avec  $1/20$  de  $\text{cm}^3$ , également 100 p. 100 de mortalité échelonnée sur six à dix jours.

Les expériences d'alimentation des vers à soie avec des feuilles de mûrier trempées dans la solution de lécithinase ont été peu nombreuses. Il était difficile, en effet, d'avoir une grande quantité de produits. Elles ont permis néanmoins de constater que les vers s'intoxiquent à la suite de l'ingestion de ces feuilles.

a) Cinq vers au cinquième âge reçoivent dix-huit repas avec des feuilles trempées dans une solution de lécithinase diluée dans huit parties d'eau (pH 7), le 30 avril 1953 et les 1<sup>er</sup>, 2, 3 et 4 mai. Un ver meurt le 4 mai 1953 avec l'aspect de flacherie. Le 6 mai 1953, deux autres sont malades, un est sacrifié et l'autre meurt le 7 mai 1953 de flacherie.

b) Cinq vers reçoivent, à partir du 1<sup>er</sup> mai 1953, à 18 h. 40, 21 repas de feuilles trempées dans une solution de lécithinase à 2/8. Tous sont en bon état jusqu'au 8 mai 1953, date à laquelle l'un des vers est mourant. Absence de germes dans l'hémolymphe, quelques streptocoques dans l'intestin. Les quatre vers qui restent deviennent courts ou filent des cocons irréguliers.

#### VI. — LÉCITHINASE D'UN AUTRE BACILLE.

Afin de comparer l'effet obtenu par une lécithinase de *B. cereus* var. *alesti* avec celui provoqué par des substances analogues chez d'autres bacilles, nous avons effectué quelques essais avec l'extrait obtenu par le même procédé à partir d'une autre souche de *B. cereus* : la souche « P3 », pathogène pour certains Lépidoptères et peu active vis-à-vis des vers à soie.

Les effets observés à la suite d'injections sont inconstants. La nocivité reste toujours bien au-dessous de celle de la lécithinase *alesti*, la mortalité n'atteignant que dans de rares cas 10 p. 100 et restant le plus souvent inférieure à 2 p. 100. Deux exemples :

a) Vingt vers reçoivent le 20 mai 1953, à 17 h. 50, 5 divisions chacun de lécithinase de « P3 ». Jusqu'au 27 mai 1953, aucune mortalité. Deux vers meurent vers le 27 mai 1953 et un le 28 mai 1953. Tous les autres font leur cocon.

b) Dix-sept vers reçoivent chacun 10 divisions de lécithinase de « P3 », aucun ne meurt jusqu'au 29 mai 1953. Tous se transforment en chrysalides.

#### CONCLUSIONS.

En culture sur bouillon, le *B. cereus* var. *alesti* libère une partie de la substance toxique qu'il contient, mais la concentration insuffisante de celle-ci dans le filtrat ne provoque qu'une action mortelle inconstante par injection. *Per os*, elle est sans action.

Les filtrats de suspensions dans l'eau physiologique de cultures sur gélose ne contiennent pas de substance toxique décelable soit par injection, soit par administration *per os*.



La congélation et décongélation suivies d'une filtration sur L3, des suspensions de colonies sur gélose, libèrent une faible quantité de substance toxique.

Le traitement des cultures par les ultrasons pendant un temps variant de quinze à cent quatre-vingts minutes altère les bacilles de telle façon qu'ils ne sont pas capables de se développer dans l'intestin. Introduits dans l'hémolymph, ils ne se développent que lentement et irrégulièrement. La substance toxique n'est pas complètement détruite et elle produit une intoxication lente par voie intestinale.

Cependant, la filtration supprime toute toxicité de la suspension, vraisemblablement par rétention dans la masse absorbante.

La lécithinase, extraite des cultures de *B. cereus* var. *alesti* selon le procédé de Chu, est toxique pour les vers à soie, injectée dans des proportions variant de 1/40 à 1/20 de centimètre cube et il y a reproduction des symptômes de la « flacherie bacillaire » naturelle. Les essais *per os*, bien que positifs mais peu nombreux, ne sont présentés ici qu'à titre d'indication et seront développés dans un travail ultérieur.

Toutes ces observations ont permis de déceler certains signes de libération de la substance toxique de *B. cereus* var. *alesti* et incitent à tenter la concentration de grandes quantités de matière virulente avec réduction de l'absorption au cours de la filtration.

D'autre part, nos essais montrent que la toxicité de *B. cereus* var. *alesti* pour les vers à soie est certainement en rapport avec la production par ce bacille, d'une lécithinase toxique pour ces insectes. Sans vouloir attribuer à cet enzyme un rôle exclusif dans la toxicité de ce germe, nous estimons que cette lécithinase doit être retenue comme l'un des facteurs de la toxicité.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. P. CHU. *J. gen. Microb.*, 1949, **3**, 255.
- [2] A. R. COLMER. *J. Bact.*, 1948, **55**, 777.
- [3] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1504.
- [4] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *Ces Annales*, 1952, **83**, 421.
- [5] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *Ces Annales*, 1953, **84**, 376.
- [6] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *Ces Annales*, 1953, **84**, 623.
- [7] C. TOUMANOFF. *Ces Annales*, 1953, **85**, 90.
- [8] C. VAGO. *C. R. Acad. Agric.*, 1951, **37**, 593.

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS  
DU VENIN D'UN VIPÉRIDÉ AFRICAIN  
*ECHIS CARINATUS* (\*)**

par G. LEFROU et J. MARTIGNOLES.

(Institut Pasteur de Kindia [Guinée].)

En janvier 1951 se manifestaient, au Togo, une dizaine de cas d'envenimation par morsure d'un serpent, dénommé « Adja » en dialecte ko'to-kotolo-togolais. Ils furent suivis de mort, malgré le traitement par doses massives du sérum antivenimeux préparé à l'Institut Pasteur à Paris, avec le venin de serpents provenant de l'Afrique Occidentale Française.

Adressé à l'Institut Pasteur de Kindia (Guinée Française), ce serpent Adja a été déterminé comme appartenant à la famille des Vipéridés du genre *Echis* et à l'espèce *Echis carinatus*.

Cette vipère, suivant la monographie d'Ancel sur les serpents de l'A. O. F., habite les régions désertiques et sablonneuses. Elle peut aussi se rencontrer dans les régions plus verdoyantes, où on la trouve sous les pierres. Très agressive, elle peut sauter pour attaquer. Elle est très venimeuse. D'habitudes semi-nocturnes, elle se nourrit d'insectes et de petits mammifères. Elle est totalement inconnue en Guinée. Au cours de l'enquête demandée, en 1939, en vue de la préparation du sérum antivenimeux, l'Institut Pasteur d'A. O. F., à Dakar, a reçu 95 serpents, dont 10 *Echis* en provenance du Niger, du Soudan et de la Mauritanie. Ce n'est donc pas un serpent particulier au Togo. Il existe aussi un *Echis carinatus* asiatique bien connu aux Indes.

Suivant les observations du Dr Salou, médecin-chef de la Subdivision Sanitaire de Sokodé, jusqu'en décembre 1949, aucun cas de mortalité n'avait été enregistré dans cette région, alors qu'une cinquantaine d'envenimations avaient été traitées et guéries par le sérum A. O.

Comme le sérum antivenimeux A. O. est préparé avec du venin des Vipéridés genre *Bitis gabonica* et *Bitis arietans*, il n'était pas surprenant que le sérum A. O. fût insuffisant contre l'envenima-

(\*) Manuscrit reçu le 25 octobre 1953.

tion par *Echis carinatus*, constatée pour la première fois au Togo.

Afin d'approvisionner en venin l'Institut Pasteur de Paris, en vue d'améliorer le sérum antivenimeux préparé contre l'envenimation par morsure de serpents de l'Afrique Occidentale Française (sérum A. O.), l'Institut Pasteur de Kindia a demandé au Togo l'envoi régulier d'*Echis carinatus* vivants. Jusqu'à ce jour, aucun territoire de l'A. O. F. n'a pu fournir de venin de ce serpent.

Dans la revue *Médecine tropicale* de juillet et août 1951, le Dr Salou précise qu'il a été enregistré au Togo, 16 cas d'envenimation mortelle par *Echis carinatus*. L'un des plus dramatiques a été celui d'un vétérinaire, chef du Service de l'Elevage du Togo, qui est mort sept jours après avoir été mordu par un *Echis*, dans le jardin de la concession qu'il habitait à Lomé. Des battues, faites à Lomé même, ont permis de découvrir quelques *Echis*. Cette vipère ne se trouve donc pas seulement dans le nord du Togo.

D'après Salou, l'envenimation par *Echis carinatus* provoque l'apparition des symptômes suivants :

1° *Signes locaux*. — Douleur vive, succédant immédiatement à la morsure dont les traces sont à peine perceptibles. Apparition rapide d'un œdème dur et douloureux, s'étendant en général jusqu'à la partie moyenne et parfois jusqu'à la racine du membre. Plus rarement, on observe des phlyctènes peu étendues, de la lymphangite et des adénopathies.

2° *Signes généraux*. — La syncope consécutive à la morsure paraît inconstante et, en général, de courte durée.

Une seule fois, elle s'est prolongée pendant plusieurs heures. Les syncopes fréquentes et les états lipothymiques, notés dans l'observation concernant le seul cas européen, n'ont pas été observés chez les Africains. L'évolution de la courbe de la température est variable. La mort survient, soit en hyperthermie, soit à température normale, exceptionnellement en hypothermie.

3° *Signes sanguins*. — Ils sont caractérisés par des hémorragies et de l'anémie.

a) *Les hémorragies* surviennent du premier au quatrième jour et cessent parfois au bout de quelques jours. Leur arrêt donne alors un faux espoir de guérison, alors que l'anémie poursuit sa marche inexorable. Exceptionnellement, elles peuvent faire défaut, alors que la maladie évolue vers l'anémie et la mort (1 cas). Les hémorragies les plus fréquemment observées sont : les hémorragies par la morsure, par les plaies antérieures ou postérieures à la morsure, par le trajet des différentes injections, les hémorragies gingivales et buccales, les hémoptysies, l'hématurie ; plus rarement les hématoméses, les entérorrhagies, les hématomes sous-cutanés ou musculaires.

b) *L'anémie*. — Elle apparaît exceptionnellement avant le quatrième jour et se manifeste cliniquement par la décoloration des muqueuses, de la tachycardie, de la dyspnée.

4° *Signes nerveux.* — Nous n'avons observé qu'une seule fois un demi-coma initial et du relâchement des sphincters. Jamais nous n'avons noté de paralysie du mouvement ou de la respiration. La dyspnée de la deuxième période est d'origine anémique et le coma terminal, qui, en général, précède de très peu la mort, paraît dû à l'ischémie des centres nerveux.

5° *Evolution de la maladie.* — La mort survient en général vers le septième jour, et jamais avant le quatrième jour.

6° *Au point de vue thérapeutique.* — L'inefficacité du sérum antivenimeux A. O. a été flagrante à des doses totales de 360 cm<sup>3</sup>.

## I. — RÉCOLTE.

Quoique les *Echis carinatus* soient considérés comme très agressives, la récolte du venin s'est faite sans difficulté par la technique ordinaire consistant à saisir la vipère près du cou avec une longue pince à mors fenêtré, puis à exprimer le venin dans une boîte de Petri, en pressant entre le pouce et l'index les glandes venimeuses.

Les *Echis* expédiées par le Togo ayant toujours été de petite taille (30 à 40 cm), la quantité de venin recueillie sur chaque exemplaire a toujours été minime, quelques milligrammes de venin sec ; une seule fois une *Echis* de 40 cm a donné 0,05 g.

Le venin d'*Echis carinatus* se présente sous la forme d'un liquide visqueux très clair. Desséché, il donne des paillettes de couleur jaune ambrée.

## II. — DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ.

A. *EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE.* — *Cobaye n° 1.* — Poids, 455 g.

Injection de 1 mg de venin (1 cm<sup>3</sup> d'une solution au 1/1 000 dans de l'eau physiologique), soit 2,2 mg au kilogramme.

Demeure en vie, mais présente une petite escarre abdominale au point d'inoculation.

*Cobaye n° 2.* — Poids, 455 g.

Injection sous-cutanée de 2 mg de venin (soit 4,4 mg au kilogramme).

Une heure après l'injection, apparition au point d'inoculation d'une petite tache ecchymotique de la grosseur d'un pois. Deux heures après, cette plaque a l'étendue d'une pièce de 5 francs avec infiltration périphérique ; celle-ci s'étend progressivement et l'animal inoculé meurt dans la nuit, vingt-deux heures après l'injection.

*Cobaye n° 3.* — Poids, 538 g.

Injection sous-cutanée de 3 mg de venin (soit 5,5 mg au kilogramme).

Le placard hémorragique apparaît dans les mêmes conditions que précédemment, la mort survient dix-huit heures après l'inoculation.

*Cobaye n° 4.* — Poids, 450 g.

Injection sous-cutanée de 2 mg de venin (soit 4,4 mg au kilogramme).



Meurt trente heures après l'inoculation avec les mêmes symptômes que précédemment.

*Cobaye n° 5.* — Poids, 400 g.

Injection sous-cutanée de 2 mg de venin (soit 5 mg au kilogramme).

Meurt seize heures après l'injection, avec les lésions déjà décrites.

*Cobaye n° 6.* — Poids, 630 g.

Injection sous-cutanée de 1,2 mg de venin (soit 2 mg au kilogramme).

Demeure en vie après avoir présenté une plaque nécrotique à la partie déclive de la région d'inoculation.

*Cobaye n° 7.* — Poids, 345 g.

Injection sous-cutanée de 1,3 mg de venin (soit 3 mg au kilogramme).

Meurt cinquante-quatre heures après l'inoculation, présentant une ulcération sanieuse au point d'inoculation ; on peut considérer que la mort n'est pas due aux effets directs de l'envenimation, mais à une infection microbienne ayant son origine dans la plaie cutanée.

*De cette expérimentation, on peut déduire que la dose minima mortelle par voie sous-cutanée chez le cobaye est 4,5 mg par kilogramme.*

EXAMEN HISTOPATHOLOGIQUE (Dr Camain, Institut Pasteur de Dakar).

*Cobaye n° 1.* — *Foie.* — Ectasie veineuse et capillaire. Tuméfaction, clarification et aspect granuleux du cytoplasme des cellules parenchymateuses sans altérations de forme, ou de chromaticité des noyaux.

*Rein.* — Congestion aiguë des vaisseaux de tous ordres, avec suffusions hémorragiques nombreuses au niveau de la corticale. Les flocules glomérulaires sont extasiés, les cellules des tubes contournés perdent leur striation basale.

*Poumon.* — Congestion, suffusions hémorragiques nombreuses, intéressant quelques alvéoles ou des plages parenchymateuses entières.

*Surrénale.* — Vastes suffusions hémorragiques dans la partie moyenne de la fasciculée ; énorme ectasie des branches afférentes de la veine surrénale. La conservation dans l'alcool ne permet pas l'étude des lipides ; il semble toutefois que glomérulaire et fasciculée aient épuisé leur charge lipidique.

*Rate.* — Rate congestive et surtout très activement érythrophagique (très nombreux macrophages bourrés de pigments hématiques).

*Cœur.* — Congestion aiguë. Les fibres myocardiques conservent toutefois leur double striation.

*Encéphale.* — Congestion, œdème interstitiel, dégénérescence (chromatolyse et vacuolisation de nombreuses cellules pyramidales).

*Cobaye n° 2.* — Les lésions hépatiques et pulmonaires sont en tous points semblables à celles du cobaye n° 1, la congestion cardiaque est encore plus accusée et se double d'un œdème interstitiel notable. La striation myofibrillaire est ici parfois altérée. On observe même quelques rares images de dégénérescence vacuolaire.

*Encéphale.* — Congestion et œdème aigu encéphalique. Chromato-

lyse et vacuolisation d'un contingent appréciable de cellules nerveuses (cellules pyramidales surtout).

Le flacon contenant rein et surrénale est arrivé brisé.

**B. EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS.** — Quatre souris, d'un poids de 15 à 22 g, ont reçu chacune en injection sous-cutanée, une dose de venin sec de 6.6 mg, 5.3 mg, 5 mg, 4.5 mg au kilogramme. Seule a survécu la souris ayant reçu 4,5 mg au kilogramme.

Les souris ayant reçu 6.6 mg et 5.3 mg sont mortes respectivement en douze et vingt-quatre heures.

La souris ayant reçu 5 mg est morte trois jours après.

Les lésions observées ont été constituées par des placards hémorragiques au point d'inoculation.

La dose minima mortelle paraît donc être de 5 mg.

**C. EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN.** — Deux lapins pesant 1.900 kg et 1.200 kg ont reçu en injection sous-cutanée chacun respectivement une dose de venin correspondant à 4 mg et 5 mg au kilogramme. Ces deux lapins ont survécu en présentant une plaque nécrotique dans la partie déclive de la région d'inoculation.

**D. EXPÉRIENCES SUR LE SINGE CYNOCÉPHALE (*Papio-papio*).** — Sept cynocéphales de poids variant de 1.500 kg à 3 kg, ont reçu par voie sous-cutanée des doses de venin sec de 5 mg, 3 mg, 2 mg, 1 mg, 0.50 mg par kilogramme.

Avec la dose de 5 mg, la mort est survenue en cinq heures.

Avec la dose de 3 à 1 mg, la mort est survenue de sept à dix-sept heures.

Avec une dose de 0,5 mg, le cynocéphale a survécu ; il est mort onze jours après des suites probables d'une septicémie consécutive à l'infection de la plaie.

Les lésions constatées à la nécropsie ont consisté en un placard hémorragique débutant à l'endroit de l'injection (côté du thorax) et s'étendant à toute la paroi abdominale.

Deux cynocéphales, de poids de 4.500 kg, ont reçu respectivement en injection intraveineuse, une dose de venin sec de 0,1 mg et 0,2 mg par kilogramme.

Le cynocéphale ayant reçu 0.2 mg est mort quelques minutes après l'injection. A la nécropsie, petit caillot au niveau d'injection. Sang non coagulé, forte congestion de l'encéphale.

Le cynocéphale ayant reçu 0,1 mg a survécu.

**Examen histo-pathologique.** — Cynocéphale, poids 2.850 kg, ayant reçu par voie sous-cutanée 9 mg de venin d'*Echis*, soit 3.2 par kilogramme.

**Foie.** — Congestion, œdème péricapillaire très marqué. Stéatose modérée des cellules hépatiques. On ne note pas ici d'hémorragies interstitielles.

**Rate.** — Enorme congestion. Rupture des parois capillaires des sinus veineux avec très nombreuses hémorragies interstitielles. Erythrolyse massive avec ou sans reprise pigmentaire macrophagique. Dissociation de la pulpe blanche. Ces images sont observées sur une rate fibreuse.

*Rein.* — Congestion, œdème. Rares hémorragies interstitielles. Les glomérules sont normaux et on n'observe pas d'hématies dans les cavités glomérulaires. Par contre, des plages de tubes contournés sont en dégénérescence granuleuse, tandis que les tubes voisins sont apparemment intacts.

*Surrénales.* — Congestion. Epuisement lipidique de la presque totalité de la corticale au niveau de laquelle on note la présence d'un petit adénome. Le stock de substance chromatique de la médullaire semble intact. Cette partie de la glande est particulièrement hyperémiée. Dans le tissu cellulo-adipeux péricapillaire, très nombreuses hémorragies interstitielles par rupture capillaire.

*Poumon.* — Congestion portant sur un poumon un peu scléreux.

*Cœur.* — Congestion, œdème. Hyperplasie des fibres myocardiques allant, pour certaines, jusqu'à la vacuolisation. Endocarde et péricarde normaux.

*Hypophyse.* — Apparemment normale. Contient surtout des cellules chromophobes.

*Encéphale.* — Congestion. Œdème péricapillaire. Petites suffusions hémorragiques par rupture endothéliale dans les espaces péricapillaires. Chromatolyse des cellules pyramidales du cortex.

*En résumé,* les doses minima mortelles exprimées en milligrammes par kilogramme de poids ont été :

Cobaye . . . . .	Voie sous-cutanée.	4,5 mg
Souris. . . . .	Voie sous-cutanée.	5 mg
Lapin. . . . .	Voie sous-cutanée.	6 mg
Cynocéphale . . . . .	Voie sous-cutanée.	1 mg
Cynocéphale . . . . .	Voie intra-veineuse.	0,2 mg

TOXICITÉ DU VENIN APRÈS CHAUFFAGE. SOLUTION DE VENIN CHAUFFÉ A 65° PENDANT UNE DEMI-HEURE.

*Cobaye n° 8.* — Poids, 300 g.

Injection sous-cutanée de 1,3 mg de venin sec, soit 4,4 mg au kilogramme.

Mort onze heures après l'inoculation. Œdème hémorragique autour du point d'inoculation et aux parties déclives, mais moins prononcé qu'avec le venin non chauffé. Congestion œdématisée du poumon. Sérosité s'écoulant par le nez.

SOLUTION DE VENIN CHAUFFÉ A 80° PENDANT UNE DEMI-HEURE. — Après chauffage la solution est devenue opalescente.

*Cobaye n° 9.* — Poids, 300 g.

Injection sous-cutanée de 1,32 mg de venin sec, soit 4,4 mg au kilogramme.

Aucune lésion locale, demeure en vie.

*Lapin.* — Poids, 1,300 kg.

Inoculation intracérébrale, 6,5 mg de venin dissous dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique soit 5 mg au kilogramme.

Immédiatement après l'injection, a présenté quelques mouvements convulsifs pendant quelques minutes, mais est demeuré en vie.

A titre de comparaison, les jours précédents il avait été inoculé à un autre lapin, par voie intracérébrale, une solution non chauffée correspondant au 1/25 de la dose mortelle par voie sous-cutanée.

Ce lapin, de poids de 1,150 kg, ayant reçu 0.23 mg. est mort une heure après en présentant, dix minutes avant la mort, des contractions spasmodiques des membres.

A la nécropsie, hémorragie intracérébrale, congestion des poumons et sang incoagulable.

*Ainsi, chauffé à 65° le venin d'Echis conserve ses propriétés toxiques ; à 80° celles-ci disparaissent entièrement.*

*Doses toxiques.* — Le tableau ci-dessous permet de comparer la toxicité des venins de vipère *Aspis* (Vipère d'Europe), *Cerastes*, *Bitis arietans*, *Bitis gabonica*, *Echis carinatus* (Vipères d'Afrique).

**Doses minima mortelles exprimées en milligrammes  
par kilogramme de poids vifs.**

	<i>Aspis</i>	<i>Cerastes</i>	<i>Arietans</i>	<i>Gabonica</i>	<i>Echis</i>
Souris S/C. . . . .	5	15	7,5	20	5
Cobaye S/C. . . . .	4,5	13,5	30	30	4,5
Lapin S/C. . . . .	6	5			6
Singe S/C. . . . .					1
Singe I/V. . . . .				0,4	0.2

S/C, Sous-cutanée; I/V, intra-veineuse.

### III. — DÉTERMINATION DE L'ACTION COAGULANTE ET ANTICOAGULANTE DU VENIN.

Ne pouvant utiliser au début de nos recherches la technique de Cesari et Boquet, faute d'avoir à notre disposition du chlorure de calcium sec nécessaire pour faire des solutions exactement titrées, nous avons employé la technique décrite par Brazil et Veillard, de l'Institut Butantan.

Celle-ci consiste à ajouter à 1 cm<sup>3</sup> de plasma sanguin citraté à 2 p. 100, privé par centrifugation des éléments figurés, des quantités progressivement décroissantes de venin, et à déterminer le temps de coagulation dans les tubes laissés à la température ordinaire. Brazil et Veillard utilisaient du plasma de lapin. Nous avons expérimenté sur le plasma humain.

Par ailleurs, nous avons fait comparativement des essais avec les venins de *Bitis arietans* et *Bitis gabonica*.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-après.



Les doses de venin étaient toujours contenues dans 1 cm<sup>3</sup> de sérum physiologique.

QUANTITÉ DE VENIN en mg	PLASMA humain en cm <sup>3</sup>	TEMPS DE COAGULATION		
		<i>Echis</i>	<i>Gabonica</i>	<i>Arietans</i>
1 . . . . .	1	20 sec.	5 min.	} Pas de coagulation en 24 h.
0,1 . . . . .	1	35 sec.	11 min.	
0,01 . . . . .	1	1 min. 15	43 min.	
0,001 . . . . .	1	3 min. 30	2 h. 25	
0,0001 . . . . .	1	6 min. 40	12 h.	

Comme la sensibilité du plasma à l'action coagulante des venins varie d'une espèce animale à l'autre, une expérimentation a été effectuée dans les mêmes conditions avec du plasma de bœuf.

En voici les résultats :

QUANTITÉ DE VENIN en mg	PLASMA de bœuf en cm <sup>3</sup>	TEMPS DE COAGULATION		
		<i>Echis</i>	<i>Gabonica</i>	<i>Arietans</i>
1 . . . . .	1	25 sec.	7 min.	C partielle. 12 h. 8 h.
0,1 . . . . .	1	50 sec.	12 min.	
0,01 . . . . .	1	2 min. 10	50 min.	
0,001 . . . . .	1	3 min. 30	3 h. 27	
0,0001 . . . . .	1	13 min.	19 h.	

Ainsi, le venin d'*Echis* a un pouvoir de coagulation *in vitro* particulièrement élevé, soit sur le plasma humain, soit sur le plasma de bœuf.

★★

Eagle a différencié l'action coagulante des venins suivant qu'ils agissaient en milieu oxalaté (effet direct décalcifiant), ou en milieu citraté (calcium non précipité, mais formant avec le citrate un complexe non ionisable).

Sur deux venins de vipères d'Asie, *Lachesis* et *Daboia*, ce dernier venin n'agissait qu'avec du plasma citraté.

Voici les résultats obtenus avec du sang de bœuf oxalaté à 1 p. 100, dans les mêmes conditions d'expérience.

Le venin d'*Echis* appartient donc à la catégorie des venins qui ont une action sur la coagulation en milieu oxalaté et citraté. Il coagule directement le fibrinogène en l'absence de prothrom-

QUANTITÉ DE VENIN en mg	SANG DE BŒUF en cm <sup>3</sup>	TEMPS DE COAGULATION
1 . . . . .	1	10 sec.
0,1 . . . . .	1	35 sec.
0,01 . . . . .	1	1 min. 35
0,001 . . . . .	1	5 min.
0,0001 . . . . .	1	15 min.

line, dont l'action nécessite la présence de calcium; certains venins, au contraire, coagulent le fibrinogène en activant la prothrombine.

#### DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTICOAGULANT.

Pour étudier le pouvoir anticoagulant, nous avons utilisé la technique indiquée par Cesari et Boquet.

Cette technique consiste à déterminer d'abord le nombre de gouttes d'une solution de chlorure de calcium au 1/100 nécessaire pour assurer la coagulation complète d'un plasma citraté à 1 p. 100. Sur une batterie de tubes à hémolyse, on verse par tube, 2 cm<sup>3</sup> de plasma citraté. Dans un premier temps, on ajoute des doses progressivement décroissantes de venin. Dans un second temps, on met le nombre de gouttes de la solution de chlorure de calcium déterminé par l'essai préalable.

Les tubes contenant le mélange sont placés à l'étuve à 37°, pendant une demi-heure.

Voici les résultats obtenus avec du venin non chauffé et du plasma de bœuf :

NUMÉRO des tubes	DOSES de venin en mg	RÉSULTATS	NUMÉRO des tubes	DOSES de venin en mg	RÉSULTATS
1 . . . . .	0,0005	O	8 . . . . .	0,1	C
2 . . . . .	0,001	O	9 . . . . .	0,25	C
3 . . . . .	0,0025	O	10 . . . . .	0,5	C
4 . . . . .	0,005	C	11 . . . . .	1	C
5 . . . . .	0,01	C	12 . . . . .	2	C
6 . . . . .	0,025	C	13 . . . . .	5	C
7 . . . . .	0,05	C			

C, coagulation; O, absence de coagulation.

Ainsi, à la dose de 5 mg. la coagulation ne peut être empêchée. Le venin d'*Echis* est un venin coagulant, comparable au venin de *Bitis gabonica*. Le venin de *Bitis arietans* possède, au contraire, un pouvoir anticoagulant élevé.

## IV. — DÉTERMINATION DE L'ACTION HÉMOLYTIQUE.

D'après les travaux de Lamb (1905), cités par M<sup>me</sup> Phisalix, les venins, du point de vue de l'action hémolytique, peuvent se diviser en deux groupes, suivant qu'ils nécessitent ou non la présence d'un activateur, sérum ou lécithine.

Dans une première série d'expériences, nous avons pris comme activateur du sérum de cheval chauffé à 56° (sérum antidiphtérique déjà chauffé à 56°), et comme globules rouges, nous avons utilisé ceux provenant de la centrifugation de plasma humain ; ces globules ont été lavés trois fois avec du sérum physiologique.

Suivant la technique de Cesari et Boquet, nous avons mis dans des tubes à hémolyse 0,5 cm<sup>3</sup> de sérum de cheval chauffé et nous avons ajouté des doses progressivement décroissantes de venin, toutes contenues dans la même quantité d'eau physiologique : 1 cm<sup>3</sup>. Les doses de venin ont été : 1 mg, 0,1 mg, 0,01 mg, 0,0001 mg. Le contact du venin et du sérum a été maintenu une heure à l'étuve à 37°. Au sortir de l'étuve, dans un premier essai, nous avons ajouté immédiatement 1 cm<sup>3</sup> d'une suspension de globules à 5 p. 100 ; dans un second essai, les tubes ont été plongés dans un bain de glace fondante avant l'adjonction des globules. Boquet et Cesari ont en effet signalé que l'hémolyse s'opérait mieux à 0° qu'à la température de 37°.

*Dans les deux essais à 0° et à 37°, le venin aux doses utilisées ne s'est pas montré hémolytique.*

Dans une seconde série d'expériences faite à 37°, la recherche de l'action hémolytique a été faite sans addition de sérum et les globules rouges humains ont été obtenus par la défibrination du sang par agitation avec des perles de verre. Les doses de venin employées ont été : 0,5 mg, 0,05 mg et 0,005 mg, toutes contenues aussi dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique.

*Il n'y a pas eu d'hémolyse.*

D'après M<sup>me</sup> Phisalix, le venin d'*Echis*, de provenance asiatique, hémolyse directement les globules lavés de chien. On sait que l'action hémolytique des venins varie suivant les espèces de globules rouges. Ainsi les venins de *Bitis*, d'après les essais faits à Pastoria par Philippe et Lloverol, sont hémolytiques sur les hématies de cheval, non sur les hématies de mouton.

M<sup>me</sup> Phisalix mentionne aussi des venins qui ne sont pas hémolytiques pour le bœuf et la chèvre et le sont pour le chien. Nous avons refait les essais décrits dans la seconde série d'expériences avec des venins de *Bitis arietans* et *Bitis gabonica*. Ceux-ci n'ont pas montré plus de pouvoir hémolytique sur les globules humains.

Dans les conditions de notre expérimentation sur les hématies

humaines. le venin d' « *Echis carinatus* » n'a aucune action hémolytique, avec activateur ou sans activateur.

#### V. — DÉTERMINATION DE L'ACTION PROTÉOLYTIQUE.

a) *Action gélatinolytique.* — Cette action a été recherchée suivant une technique couramment utilisée vis-à-vis des venins, en prenant d'abord comme substance protéique du bouillon gélatiné à 1,5 p. 100, milieu de culture courant en bactériologie. A 1 cm<sup>3</sup> de ce bouillon gélatiné, est mélangé 1 cm<sup>3</sup> d'une solution de venin d'*Echis* à doses progressivement croissantes. Et par comparaison, des solutions identiques de venin de *Bitis* ont été aussi utilisées :

NUMERO des tubes	DOSES du venin en mg	<i>Echis</i>		<i>Bitis gabonica</i>			<i>Bitis arietans</i>		
		1 h.	24 h.	1 h.	24 h.	36 h.	1 h.	24 h.	36 h.
1 . . . . .	0,1	—	+	—	—	—	—	—	—
2 . . . . .	0,2	—	++	—	—	—	—	—	++
3 . . . . .	0,3	—	++	—	—	+	—	—	++
4 . . . . .	1	++	++	—	—	++	++	++	++

++, protéolyse totale (liquéfaction complète); +, protéolyse partielle; —, pas de protéolyse.

Comme les modifications du pH peuvent intervenir dans la liquéfaction de la gélatine, les mélanges ont été mis de suite à la glacière pour éprouver la solubilité; ensuite ils ont été laissés à la température du laboratoire, 27°, et remis à la glacière pour la lecture.

Dans les conditions de cette expérience, le venin d'*Echis* a une action gélatinolytique très accentuée, ce qui le différencie très nettement des venins de *Bitis*.

b) *Action fibrinolytique.* — L'action fibrinolytique a été déterminée sur du sang humain. Le sang prélevé aseptiquement à la seringue a été réparti à la dose de 2 cm<sup>3</sup> dans des tubes à hémolyse stérilisés.

Dans chaque tube il a été ajouté 0,01 cm<sup>3</sup> de venin dissous dans 4 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Dans les tubes 1 et 2 la solution de venin a été ajoutée telle qu'elle était préparée à la température extérieure à 25°. Pour le tube 3, la solution a été chauffée au bain-marie à 60° pendant trente minutes, et ajoutée après refroidissement.

Pour le tube 4, la solution a été chauffée à 70°.



Pour le tube 5, la solution a été chauffée à 80°.

Ainsi les propriétés protéolytiques du venin d'*Echis carinatus* se traduisent par une action gélatinolytique et fibrinolytique.

L'action fibrinolytique est variable suivant la température. Avec la notion maintenant exposée sur le mécanisme de la fibrinolyse concernant la streptokinase et la streptodornase, il nous

NUMÉRO des tubes	POIDS caillot	DOSE venin	TEMPÉRATURE	DÉLAI		
				7 h.	12 h.	24 h.
1. . . . .	1,300	0,01	25°	++	++	++
2. . . . .	1,800	0,01	25°	++	++	++
3. . . . .	1,650	0,01	60°	—	—	+
4. . . . .	1,400	0,01	70°	—	—	+
5. . . . .	1,450	0,01	80°	—	—	++

++, fibrinolyse totale; +, fibrinolyse partielle; —, pas de fibrinolyse.

paraît que l'action fibrinolytique après vingt-quatre heures ne relève plus de l'action du venin, mais de l'enzyme fibrinolytique normalement contenu dans le sang humain.

Il y a là des faits qui peuvent prêter à de nouvelles recherches.

#### CONCLUSIONS.

a) Les symptômes de l'envenimation par *Echis carinatus* sont ceux qui caractérisent l'envenimation par les Vipéridés : accidents locaux (œdème et gangrène) et phénomènes hémorragiques.

b) Du point de vue histo-pathologique, l'attention est retenue par les lésions constatées sur le cœur, les surrénales et l'encéphale des cobayes et des cynocéphales.

c) Le venin d'*Echis* a un pouvoir de coagulation très élevé sur le plasma sanguin.

d) Il n'a pas d'action hémolytique sur les hématies humaines.

e) Il a des propriétés protéolytiques se traduisant par une action gélatinolytique et fibrinolytique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- M. PHISALIX. *Les animaux venimeux et les venins*, 2 vol. Paris 1922, Masson et C<sup>ie</sup>, édit.
- V. BRAZIL et J. VEILLARD. *Ces Annales*, 1928, **42**, 403.
- E. CESARI et P. BOQUET. *Ces Annales*, 1935, **55**, 307.
- RAZEMONT et RIBET. *La Presse Médicale*, 7 juillet 1951.
- G. SALOU. *Med. trop.*, 1951, **41**, 655.
- A. BERTOYE et P. DETOLLE. *Ces Annales*, 1952, **83**, 248.

# ACTION DE LA CHALEUR SUR LE SÉRUM DE CHEVAL

par P. SLIZEWICZ (\*).

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

En 1941, van der Scheer, Wyckoff et Clarke [4] ont étudié l'influence du chauffage sur le diagramme électrophorétique du sérum de cheval. Le chauffage aux environs de 65° conduit à la formation d'un composé colloïdal ayant approximativement la mobilité électrophorétique des globulines  $\beta$ . Il nous a paru intéressant de reprendre cette étude au moyen de deux techniques différentes, l'ultracentrifugation analytique et l'électrophorèse sur papier.

La technique d'ultracentrifugation est celle qui a déjà été décrite [2]. L'électrophorèse sur papier est réalisée avec l'appareil de Machebœuf et Rebeyrotte [3]. Dans tous les cas, c'est le sérum pur qui a été chauffé puis dilué, soit par quatre fois son volume d'eau physiologique en vue de l'ultracentrifugation, soit par la moitié de son volume en vue de réaliser l'électrophorèse sur papier.

## I. — ACTION DE LA TEMPÉRATURE DE CHAUFFAGE.

1° ULTRACENTRIFUGATION. — Des expériences de Mac Farlane [4] ont montré que le chauffage pendant deux heures et demie à 56° C ne modifie pratiquement pas le diagramme d'ultracentrifugation du sérum de bœuf. Dans nos expériences, nous avons utilisé des températures légèrement supérieures : 60°, 64° et 67°5 C. Nous avons vu [2] que l'ultracentrifugation permettait de mettre en évidence dans le sérum trois fractions : A, B et C. Les résultats des ultracentrifugations après chauffage pendant dix minutes aux températures indiquées, sont résumés dans le tableau I. Voir aussi les diagrammes d'ultracentrifugation correspondants (Fig. 1.)

On voit que l'augmentation des constantes de sédimentation est proportionnelle à la température de chauffage. Notons aussi la diminution de l'aire comprise entre la courbe et la ligne de base. Ceci peut traduire la diminution de la concentration protéique

(\*) Manuscrit reçu le 18 décembre 1953.

TABLEAU I. — Valeur des constantes de sédimentation  
(Unités Svedberg).

Sérum	Fractions		
	A	B	C
Normal	16,8 $\pm$ 1	6,8 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,3
Chauffé à 60°	18,5 $\pm$ 1	7,1 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,3
Chauffé à 64°	20,0 $\pm$ 1	7,5 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,3
Chauffé à 67°5		9,3 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 0,4

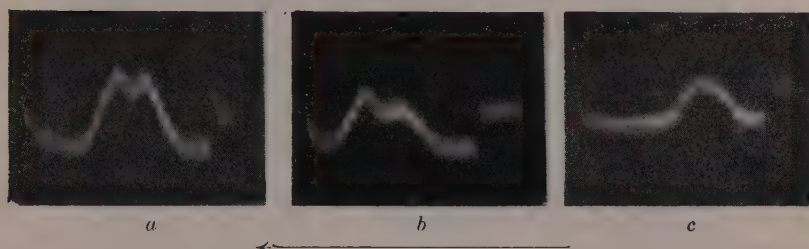


FIG. 1. — Diagramme d'ultracentrifugation (720 t/s) d'un sérum chauffé 10 minutes : a) à 60°, 73 minutes de centrifugation ; b) à 64°, 60 minutes de centrifugation ; c) à 67°5, 40 minutes de centrifugation.

La fraction A qui est présente dans les deux premiers échantillons a sédimenté complètement au moment où sont pris ces clichés.

dans le liquide : le chauffage ayant amené la formation d'un complexe protéique dont la constante de sédimentation est telle qu'il sédimente pendant la durée de l'accélération.

2° ELECTROPHORÈSE. — La figure 2 représente les diagrammes d'électrophorèse sur papier des échantillons de sérum chauffé à différentes températures. On voit qu'il se forme aux dépens des albumines et des globulines  $\gamma$  un complexe protéique ayant la mobilité des globulines  $\beta$  (1). Après chauffage à 67°5 une certaine quantité de protéines ne se déplace plus dans le champ électrique. Remarquons enfin qu'il subsiste, quelle que soit la température de chauffage, une fraction ayant la mobilité des albumines : ce qui n'est pas le cas quand on chauffe une solution de sérum albumine dans l'eau distillée [5].

(1) Lecomte du Noüy avait déjà noté l'influence du chauffage sur les globulines du sérum. Les globulines dans le sérum chauffé ne précipitent plus par dilution avec l'eau distillée.

## II. — INFLUENCE DU pH.

Le pH du sérum conservé à la glacière est 7,95. Un échantillon est acidifié jusqu'à pH 7,5 ; un autre est alcalinisé jusqu'à 8,3. Les deux sont chauffés dix minutes à 61°. La figure 3 montre que les diagrammes d'ultracentrifugation ne sont pratiquement

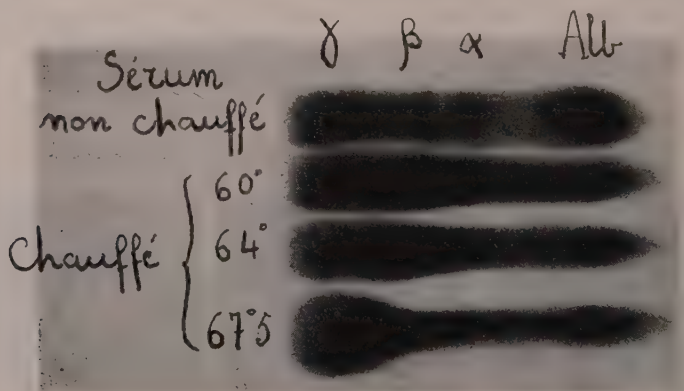


FIG. 2. — Electrophorèse sur papier. Echantillons de sérum chauffé 10 minutes aux températures indiquées sur la figure.



FIG. 3. — Diagramme d'ultracentrifugation (720 t/s) d'un sérum chauffé 10 minutes à 64° : a) pH 7,5, 90 minutes de centrifugation ; b) pH 7,3, 83 minutes de centrifugation.

pas modifiés (Les comparer aussi avec la figure 1 b correspondant au sérum à pH 7,5).

Les constantes de sédimentation des trois fractions, exprimées en unités Svedberg, sont :

	A	B	C
A pH 7,5 . . . . .	$21 \pm 1$	$7,2 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,3$
A pH 8,3 . . . . .	$21 \pm 1$	$7,2 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,3$



La figure 4 représente les diagrammes correspondants d'électrophorèse sur papier. On voit qu'à pH 7,5 7,95 ou 8,3 l'action d'un chauffage de dix minutes à 64° C est très sensiblement la même.

### III. — INFLUENCE DE LA DURÉE DU CHAUFFAGE.

1° ULTRACENTRIFUGATION. — Les clichés de la figure 5 représentent les diagrammes d'ultracentrifugation d'échantillons de

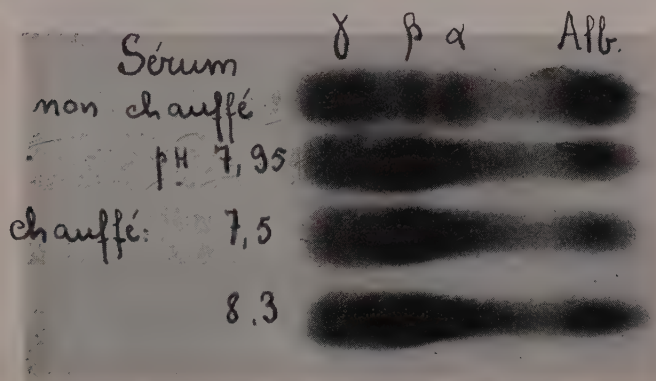


FIG. 4. — Electrophorèse sur papier. Echantillons de sérum à différents pH chauffés 10 minutes à 64°.

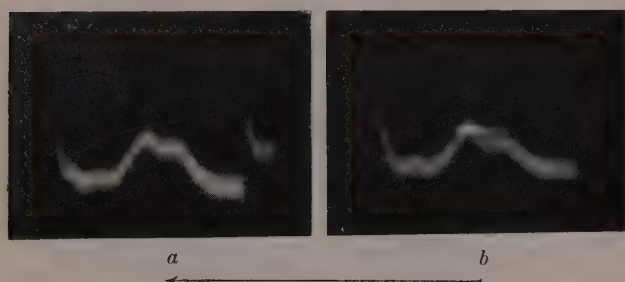


FIG. 5. — Diagrammes d'ultracentrifugation (60 minutes à 720 t/s). Sérum chauffé à 64° : a) 20 minutes ; b) 30 minutes.

sérum chauffés vingt et trente minutes à 64° C. On voit qu'ils sont tout à fait comparables à celui du sérum chauffé dix minutes (fig. 1 b).

Les constantes de sédimentation sont les suivantes :

	A	B	C
Sérum chauffé 20 minutes .	$21 \pm 1$	$7,7 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,3$
Sérum chauffé 30 minutes .	$20 \pm 1$	$7,9 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,3$

Elles ne sont pas modifiées par la durée du chauffage.

2° ELECTROPHORÈSE. — Au contraire les diagrammes d'électrophorèse montrent nettement l'influence du temps de chauffage. On voit, en particulier sur la figure 6, que le déplacement sur le

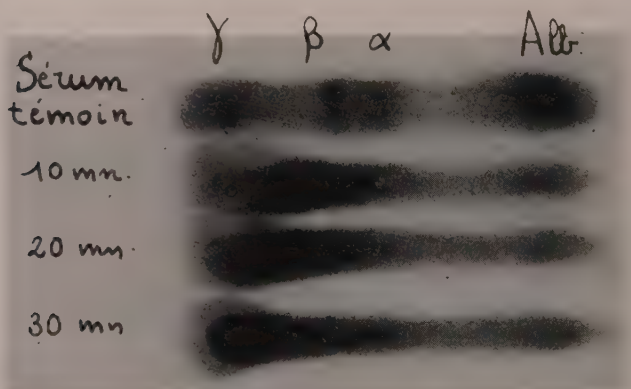


FIG. 6. — Echantillons de sérums chauffés à 64° C pendant des temps variables.

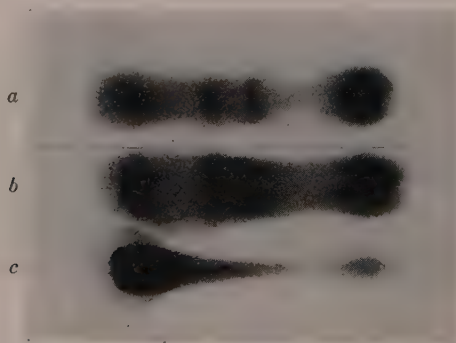


FIG. 7. — a) sérum témoin ; b) sérum chauffé puis centrifugé à 720 t/s pendant 2 h 1/2 ; c) culot de centrifugation.

papier, du complexe formé diminue quand la durée du chauffage augmente.

La figure 7 montre comparativement au sérum témoin, le sérum chauffé puis centrifugé deux heures et demie à 720 t/s (accélération moyenne, 120 000 g). On a déposé sur la piste inférieure le culot recueilli au cours de cette ultracentrifugation, puis

remis en solution dans l'eau physiologique. On voit que le sérum chauffé, puis ultracentrifugé, possède un diagramme d'électrophorèse assez semblable à celui du sérum normal. Mais un nouveau chauffage de dix minutes à 64° provoque la formation d'un nouveau complexe. C'est ce que montre la figure 8. On dépose sur la piste supérieure 2,5 mm<sup>3</sup> de sérum chauffé puis ultracentrifugé, sur la piste inférieure 2,5 mm<sup>3</sup> de l'échantillon précédent chauffé dix minutes à 64° C. On voit nettement que ce traitement fait apparaître une nouvelle fraction protéique.

#### RÉSUMÉ.

Le chauffage aux environs de 65° C du sérum de cheval provoque la formation d'un complexe protéique que révèle l'électro-

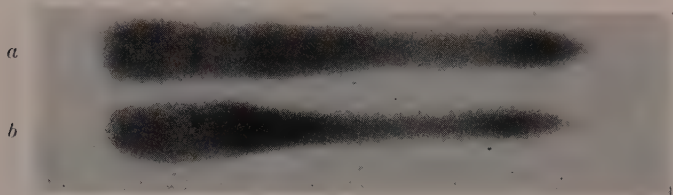


FIG. 8. — a) sérum chauffé 10 minutes à 64° C puis centrifugé 2 h à 720 t/s ;  
b) comme a) puis chauffé à nouveau 10 minutes à 64° C.

phorèse sur papier et qui peut être isolé facilement par ultracentrifugation préparative. Sa constante de sédimentation élevée et sa faible concentration quand on dilue le sérum font qu'il n'est pas visible sur les clichés d'ultracentrifugation analytique.

On montre par ailleurs l'influence du temps de chauffage dans la formation de ce composé. Lorsque le chauffage dépasse 65°, on note une nette augmentation des constantes de sédimentation des différentes fractions.

Le chauffage du sérum laisse subsister une fraction qui se déplace au cours de l'électrophorèse sur papier comme les albumines, ce qui n'est pas le cas quand on chauffe une solution d'albumine dans l'eau distillée.

Ces résultats sont valables entre pH 7,5 et pH 8,3 (2).

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. VAN DER SCHEER, R. W. G. WYCKOFF et CLARKE, *J. Immunol.*, 1941, **40**, 39.

(2) Nos résultats sont en bon accord avec ceux décrits par Ardry [7] dans l'étude électrophorétique du sérum humain chauffé.

- [2] P. SLIZEWICZ. *Ces Annales*, 1954, **86**, 189.
- [3] M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE et M. BRUNERIE. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1543.
- [4] A. S. MAC FARLANE. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 407.
- [5] P. LECOMTE DU NOÛY. *Ces Annales*, 1932, **48**, 187.
- [6] E. BARBU, M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE et P. SLIZEWICZ. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **24**, 724.
- [7] R. ARDRY. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 236 et 242.



**DONNEES ACTUELLES**  
**SUR LE PARASITISME INTESTINAL ET SANGUIN**  
**DES DIFFÉRENTES POPULATIONS AFRICAINES**  
**DE L'AGGLOMÉRATION DE BRAZZAVILLE**

par Louis LAMY et H. LAMY (\*).

*(Institut Pasteur, Paris,  
et Institut Pasteur de Brazzaville.)*

Les résultats que nous apportons constituent la partie statistique d'une enquête commencée à la fin du mois d'août 1952 et poursuivie jusqu'en mars 1953, chez les enfants (1) et les adultes des différentes populations africaines de la région de Brazzaville (2) : dans les différents centres médicaux et, en particulier, aux Dispensaires Adultes et de Puériculture de Poto-Poto, de Bacongo et de Ouenzé, à la Consultation des Trypanosomés à l'Institut Pasteur et à l'Infirmerie de garnison, pour des sujets se présentant d'eux-mêmes à la visite médicale ; au service de délivrance des passeports sanitaires à l'Institut Pasteur, dans les différentes Ecoles indigènes, à la Maison d'Arrêt, au Centre de Rééducation et dans les groupements militaires, pour des sujets théoriquement normaux et ne demandant pas de secours médical.

Nous avons, ainsi, une vue d'ensemble actuelle sur l'état du parasitisme chez les différentes populations de la région de Brazzaville. Les résultats groupent un ensemble de 2 850 examens coprologiques et sanguins portant sur 1 511 sujets.

(\*) Manuscrit reçu le 27 novembre 1953.

(1) Nous avons donné au Colloque de l'Enfance, qui s'est tenu en décembre 1952, à Brazzaville, un premier aperçu des résultats obtenus chez les enfants.

(2) Nous tenons à exprimer ici toute notre gratitude à M. le médecin Colonel Ceccaldi, qui nous a accueilli à l'Institut Pasteur avec beaucoup de bienveillance et a mis tous les moyens de travail à notre disposition. Nous remercions également M. le médecin Commandant Merle, M. le Dr Estival et M. le médecin Capitaine Conforto, qui ont grandement facilité notre tâche.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Quel que soit l'examen demandé, nous avons fait systématiquement un examen coprologique et un examen du sang.

*Pour l'examen de sang, nous pratiquons :*

Un examen extemporané pour la recherche des filaires :

Un frottis et une goutte épaisse que nous colorions au May-Grünwald-Giemsa, pour la recherche des hématozoaires et des filaires.

*Pour l'examen coprologique, nous pratiquons :*

Un examen extemporané dans l'eau physiologique, pour rechercher, en particulier, les amibes et protozoaires vivants, à l'état de formes végétatives.

Un examen dans le lugol fort, pour rechercher plus particulièrement les kystes et pour faire la détermination proprement dite des différentes espèces amibiennes.

La recherche des œufs d'helminthes se fait, à la fois, dans les deux préparations et aux différents grossissements.

Pour serrer le problème de plus près, nous avons repris un certain nombre de cas négatifs :

En faisant, avec les mêmes techniques, plusieurs examens successifs, aussi bien pour les selles que pour le sang, afin d'éviter les périodes négatives.

En faisant une concentration par le procédé simple de la saumure, pour rechercher les œufs d'helminthes.

En pratiquant une culture sur milieu diphasique à base de sérum de cheval coagulé, de Ringer additionné de sérum liquide et d'amidon de riz.

En colorant, dans les cas douteux, par l'hématoxyline ferrique, des frottis humides de selles ou de cultures, pour déterminer avec précision une espèce amibienne.

Nous avons recherché ainsi, systématiquement, l'ensemble de tous les parasites : Protozoaires intestinaux (Amibes, Flagellés, Coccidies, Infusoires), Helminthes intestinaux, parasites sanguins (Hématozoaires et Filaires).

Nous ne donnerons, dans cette note, que les résultats statistiques de notre enquête, sans faire de comparaison avec les chiffres donnés par nos prédécesseurs : ceux que nous apportons sont le reflet de la situation parasitaire actuelle, nous avons essayé de les obtenir aussi complètement que possible et dans les meilleures conditions, en pratiquant nous-mêmes tous les examens.

## DONNÉES STATISTIQUES.

Les premiers chiffres que nous donnons correspondent à un seul examen, ils ne représentent donc qu'un *minimum*. Pour chaque espèce intéressante, nous indiquerons les *corrections*

à apporter, pour avoir le pourcentage de l'infestation se rapprochant le plus de la réalité.

Les résultats ont été groupés en tableaux qui indiquent :

Tabelau I. — Le parasitisme intestinal à Protozoaires.

Tableau II. — Les rapports entre porteurs d'amibes dysentériques, dysenteries amibiennes et dysenteries d'autres origines.

Tableau III. — Le parasitisme intestinal à helminthes.

Tableau IV. — Le parasitisme sanguin à *Plasmodium* et à filaires.

Tableau V. — Différents groupements comparatifs des parasites les plus pathogènes.

Dans chaque tableau, nous donnons, pour chaque espèce parasite :

Le nombre des examens positifs (+).

Le nombre des examens négatifs (0).

Le pourcentage (p. 100) des cas positifs, par rapport à l'ensemble des examens.

Chacun de ces résultats est donné pour :

Les enfants jusqu'à l'âge d'environ 1 an.

Les enfants au-dessus de 1 an.

L'ensemble de tous les enfants.

Les adultes.

L'ensemble de toute la population.

Dans le cas des parasites pathogènes, les résultats ont été donnés séparément pour chacune des trois grosses agglomérations de Brazzaville : Poto-Poto (= PP), Bacongo (= B), Ouenzé (= O).

Nous avons fait une distinction entre les enfants au-dessous d'un an et les autres, pour montrer les variations de pourcentage que l'on obtient selon que l'on fait ou non cette distinction et pour en tirer les conclusions correspondantes. En effet, jusqu'au moment où l'enfant commence à marcher et tant qu'il est presque constamment sur le dos de sa mère et que sa nourriture consiste presque essentiellement en lait maternel, il est normal qu'il ne subisse qu'au minimum les attaques des ankylostomes, par exemple, dont les larves pénètrent activement par la peau des pieds, en particulier, de même que celles des ascaris et helminthes, ou, même des protozoaires qui pénètrent dans le tube digestif par la voie buccale, à la faveur du contact des mains sales ou par absorption d'eau ou de légumes contaminés. Pour les parasites transmis par insectes piqueurs, il en va, naturellement, tout autrement.

#### *Protozoaires intestinaux (tableau I) : E. dysenteriae.*

Comparativement avec ce que nous verrons pour d'autres parasitoses, on est tenté de dire que le parasitisme à amibes dysen-

TABLEAU I. — Parasitisme intestinal à Protozoaires.

PARASITES	LOCALITES	Enfants au-dessous de 1 an.			Enfants au-dessus de 1 an.			Ensemble des Enfants.			Adultes.			Ensemble de la Population		
		+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%
<i>Entamoeba dysenteriae</i>	Poto-Poto	0	60	0	17	170	9,1	17	230	7	17	232	6	34	462	7
	Bacongo	0	49	0	14	121	10	14	170	8,2	6	74	8	20	244	8
	Ouenzé	0	16	0	16	88	15,4	16	104	15	12	60	20	28	164	17
	Total	0	125	0	47	379	11	47	504	8,5	35	366	9	82	870	9
	Corrections															
<i>Entamoeba coli</i>		1	124	0,8	21	405	5	22	529	4	22	379	5,5	44	908	4,6
<i>Endolimax nana</i>		0	125	0	7	419	1,6	7	544	1,2	7	394	1,8	14	938	1,3
<i>Iodamoeba bütschlii</i>		0	125	0	1	425	0,2	1	550	0,1	7	394	1,8	8	944	0,8
<i>Giardia intestinalis</i>		1	124	0,8	29	397	7	30	521	5,5	10	391	2,5	40	912	4,2
	Corrections															
<i>Enteromonas</i>					69	357	16	69	482	12,5						
<i>Chilomastix mesnili</i>		0	125	0	13	413	3	13	538	2,4	16	385	4	29	923	3,1
<i>Trichomonas hominis</i>		0	125	0	7	419	1,6	7	544	1,2	4	397	1	11	941	1,1
<i>Coccidies</i>																
<i>Balantidium</i>																
1 seul cas																
Aucun cas décelé																
Aucun cas décelé																

tériques est faible : 1° parce que le pourcentage des porteurs est bien inférieur à celui des porteurs d'ankylostomes et d'ascaris, par exemple ; 2° parce que les dysenteries aiguës d'origine amibienne certaine sont très rares.

Nous donnons dans un tableau séparé (tableau II), les résultats comparatifs concernant les porteurs d'amibes dysentériques, les dysenteries amibiennes certaines et les dysenteries d'autres origines :

Chez l'enfant au-dessous d'un an, nous n'avons constaté ni dysenterie amibienne, ni porteurs d'amibes, alors que 10 p. 100



TABLEAU II. — Porteurs d'amibes dysentériques, dysenteries amibiennes et autres dysenteries.

PARASITES	LOCALITES	Enfants au-dessous de 1 an			Enfants au dessus de 1 an			Ensemble des Enfants			Adultes			Ensemble de la Population		
		+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%
Porteurs d'Entamoeba dysenteriae	Poto-Poto	0	60	0	13	174	7	13	234	5,9	16	233	6,45	29	467	5,8
	Baongo	0	49	0	8	127	6	8	176	4,35	4	76	5,2	12	252	4,5
	Ouenzé	0	16	0	15	89	15	15	105	12,5	14	58	19,5	29	163	15,1
	Total	0	125	0	36	390	8,5	36	515	6,5	34	367	8,5	68	884	7,1
Dysenteries amibiennes	Poto-Poto	0	60	0	4	193	2	4	243	1,6	1	248	7	5	491	1
	Baongo	0	49	0	3	132	2,2	3	181	1,6	1	79	1,25	4	260	15,1
	Ouenzé	0	16	0	2	102	2	2	118	1,6	1	71	1,4	3	189	1,3
	Total	0	125	0	9	417	2,10	9	542	1,6	3	398	7,5	12	940	1,2
Autres dysenteries	Poto-Poto	4	56	6,66	7	180	3,75	11	236	4,5	13	236	5,2	24	472	4,9
	Baongo	6	43	12,2	1	134	0,74	7	177	3,8	1	79	1,25	8	256	3,1
	Ouenzé	2	14	12,5	1	103	1	3	117	2,5	1	71	1,4	4	188	2,1
	Total	12	113	9,6	9	417	2	21	530	4	15	386	3,7	36	916	3,7

de ces enfants présentaient des dysenteries d'un autre ordre.

Chez l'enfant au-dessus d'un an, 8,5 p. 100 sont porteurs d'amibes dysentériques, avec un maximum de 15 p. 100, à Ouenzé; 2 p. 100 des sujets présentaient une dysenterie amibienne (de même à Ouenzé) et 2 p. 100 une dysenterie d'autre origine.

Chez les adultes, nous trouvons 8 p. 100 de porteurs d'amibes dysentériques avec un maximum de 19,5 p. 100, à Ouenzé, moins de 1 p. 100 de dysenteries amibiennes et 3 p. 100 de dysenteries d'autres origines.

Au point de vue général, ceci fait :

Porteurs d'amibes :

Pour l'ensemble des enfants . . . . .	6,5 p. 100
Pour l'ensemble de la population . . . . .	7,1 p. 100

Dysenteries amibiennes :

Pour l'ensemble des enfants . . . . .	1,6 p. 100
Pour l'ensemble de la population . . . . .	1,2 p. 100

Dysenteries d'autres origines :

Pour l'ensemble des enfants . . . . .	4 p. 100
Pour l'ensemble de la population . . . . .	3,7 p. 100

En somme, il y a très peu de dysenteries amibiennes et, nettement, plus de dysenteries d'autres origines, principalement chez l'enfant au-dessous d'un an. Ceci montre qu'il faut être très prudent dans le diagnostic des dysenteries avec selles glaireuses et sanglantes.

En reprenant les cas négatifs du premier examen, par les techniques indiquées plus haut, nous pouvons estimer que nous récupérons environ 5 p. 100 de porteurs d'amibes dysentériques chez les enfants au-dessus d'un an et, pour ainsi dire, rien chez les enfants au-dessous d'un an. Ceci porte les pourcentages à 15 p. 100 au-dessus d'un an, à 12 p. 100, pour l'ensemble des enfants, à 17,5 p. 100 pour les adultes et à 14,3 p. 100 pour l'ensemble de la population.

#### *Autres parasites.*

Il est à noter qu'un parasite banal à Paris, comme *Entamæba coli* est extrêmement peu fréquent ici (moins de 5 p. 100) ; il en est, d'ailleurs, de même pour tous les parasites non pathogènes. Nous avons rencontré également : *Iodamæba bütschlii* et *Endolimax nana*. Peu de Flagellés : *Giardia intestinalis* (12 p. 100, pour l'ensemble des enfants, en tenant compte d'une correction de 10 p. 100 sur les premiers examens négatifs), *Enteromonas* et *Embadomonas*, *Chilomastix mesnili*, *Trichomonas* (1 seul cas). Pas de Coccidies, ni de *Balantidium*.

#### *Helminthes intestinaux (tableau III) : Nématodes.*

Nous commençons par les Nématodes qui constituent un des aspects le plus important du parasitisme de cette région. Les espèces les plus pathogènes, ascaris et ankylostomes, ont ici la plus vaste répartition et donnent les plus forts pourcentages de

TABLEAU III. — Parasitisme intestinal à Helminthes.

PARASITES	LOCALITES	Enfants au-dessous de 1 an						Enfants au-dessus de 1 an						Ensemble des Enfants						Adultes						Ensemble de la Population					
		de 1 an			de 1 an			de 1 an			de 1 an			Enfants			Enfants			Adultes			Adultes			Ensemble de la Population					
		+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%			
Ascaris	Poto-Poto	12	48	20	91	96	48,6	103	144	41,6	77	172	30,8	180	316	36,1															
	Bacongo	0	49	0	69	66	51	69	115	37,2	18	62	22,3	87	177	33															
	Ouenzé	5	11	31,2	53	51	49	58	62	48,5	34	38	47,2	92	100	47,8															
	Total	17	108	12	213	213	50	230	321	41,7	129	272	32,2	359	593	37,7															
	Correction				234	192	55	251	300	45,5	172	229	43	423	529	44															
Ankylostomes	Poto-Poto	12	48	20	93	94	50	105	142	42,5	82	167	32,8	187	309	37,2															
	Bacongo	4	45	8	66	69	49	70	114	38,2	57	23	71,2	127	137	48,3															
	Ouenzé	1	15	6	65	39	62,5	66	54	55	48	24	66,6	114	68	62,8															
	Total	17	108	12	224	202	59,3	241	310	43,6	187	214	46,6	455	524	46,5															
	Correction				294	132	69	311	240	56,5	277	124	69	588	364	61,7															
Trichocephales		5	120	4	44	382	10,3	49	502	8,9	25	376	6,2	74	878	7,5															
Anguillules		3	122	2,4	17	409	4	20	531	3,61	29	372	7,24	49	903	5,15															
Oxyures																															
Cestodes																															
Douves																															
Schistosomes																															
		Pour mémoire																													
		Aucun cas décelé																													
		Pas de parasites autochtones - Pas de vecteurs.																													

contamination. Ceux-ci semblent, d'ailleurs, calqués les uns sur les autres et, à quelques variantes près, sont sensiblement équivalents pour l'une et l'autre espèce. Les pourcentages corrigés donnent :

*Ascaris* :

Au-dessous d'un an . . . . .	13,5	p. 100
Au-dessus d'un an . . . . .	55	—
Pour l'ensemble des enfants . . . . .	45,5	—
Pour les adultes . . . . .	43	—
Pour l'ensemble de la population . . . . .	44	—

*Ankylostomes :*

Au-dessous d'un an. . . . .	43,5	p. 100
Au-dessus d'un an . . . . .	69	—
Pour l'ensemble des enfants . . . . .	56,5	—
Pour les adultes . . . . .	69	—
Pour l'ensemble de la population. . . . .	61,7	—

A Ouenzé, le pourcentage corrigé des ankylostomes atteint 76 p. 100 chez l'enfant au-dessus d'un an et s'accroît même jusqu'à 80 p. 100 chez l'adulte.

Les autres Nématodes : Trichocéphales, Anguillules, Oxyures, sont pour peu de chose dans les infestations à Helminthes.

*Autres Helminthes.*

Nous ne parlerons pas des *Cestodes*, relativement peu fréquents chez les enfants dont l'alimentation carnée est très réduite. Pour les *Trématodes*, nous n'avons rencontré aucun œuf de Distomiens ; quant aux *Schistosomes*, ils n'existent pas dans cette région, non pas faute de porteurs, car il y a des bilharziens venant, en général, de l'Oubangui-Chari et du Tchad, mais faute de mollusques vecteurs, si bien que le cycle évolutif ne peut être bouclé.

*Parasitisme sanguin (tableau IV) : Plasmodium.*

Les chiffres que nous donnons concernent l'ensemble de *P. falciparum* et de *P. vivax*, la première espèce représentant, à elle seule, la presque totalité des cas de paludisme.

En revoyant de près les cas négatifs, nous arrivons à récupérer, environ, 10 p. 100 de porteurs d'hématozoaires, ce qui donne les pourcentages suivants :

46,3 p. 100, pour l'ensemble des enfants, avec 33 p. 100 au-dessous d'un an et 52 p. 100 au-dessus d'un an ;

15 p. 100, seulement, chez l'adulte ;

35 p. 100, pour l'ensemble de la population.

Contrairement à ce qui se passe pour les infestations à Protozoaires et Helminthes, il n'y a aucune raison pour que le pourcentage des sujets positifs ne soit pas élevé dès le premier âge : en effet, dès sa naissance, l'enfant est soumis aux attaques des moustiques et peut donc être contaminé. Les chiffres illustrent bien ce fait, puisque, pour l'amibe dysentérique, par exemple, le pourcentage est nul chez l'enfant au-dessous d'un an ; pour les ascaris et les ankylostomes, il est quatre fois moindre avant un an qu'après et, pour les Hématozoaires, le pourcentage atteint la moitié. A Bacongo, où nous avons relevé les plus forts indices de contamination palustre, nous trouvons égalité de pourcentage



TABLEAU IV. — Parasitisme sanguin.

PARASITES	LOCALITES	Enfants au-dessous de 1 an						Enfants au-dessus de 1 an						Ensemble des Enfants						Adultes						Ensemble de la population					
		de 1 an			de 1 an			de 1 an			de 1 an			Enfants			Enfants			Adultes			Adultes			Ensemble de la population			Ensemble de la population		
		+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%
Plasmodium	Poto-Poto	7	89	7	140	128	52,5	147	217	40,3	21	79	21	79	21	79	21	79	21	79	21	79	21	79	21	168	296	36,3	168	296	36,3
	Bacongo	45	55	45	71	82	46,5	116	137	46	5	53	8,6	137	46	5	53	8,6	137	46	5	53	8,6	137	46	121	190	39	121	190	39
	Ouenzé	12	36	25	46	79	37	58	115	33,5	4	47	8	115	33,5	4	47	8	115	33,5	4	47	8	115	33,5	62	162	27,3	62	162	27,3
	Total	64	180	31	257	296	46,5	321	476	40,5	30	179	14,3	476	40,5	30	179	14,3	476	40,5	30	179	14,3	476	40,5	351	655	35	351	655	35
	Correction	82	162	33	287	266	52	369	428	46,3	39	170	20	428	46,3	39	170	20	428	46,3	39	170	20	428	46,3	408	598	17	408	598	17
Filaires	Poto-Poto				0	296					54	370	127				54	370	127												
	Bacongo				0						1	100	1				1	100	1												
	Ouenzé				0	9					10	52	16,1				10	52	16,1												
	Total				0	305					65	522	11,7				65	522	11,7												

de sujets positifs, quel que soit l'âge : 50 p. 100 des enfants de moins ou de plus d'un an sont paludéens. A partir de 2 mois, nous relevions déjà des hématozoaires dans le sang (enfant né le 9 septembre 1952, positif le 8 novembre 1952). A Poto-Poto, nous atteignons tout juste 10 p. 100 avant un an et, à Ouenzé, environ 30 p. 100.

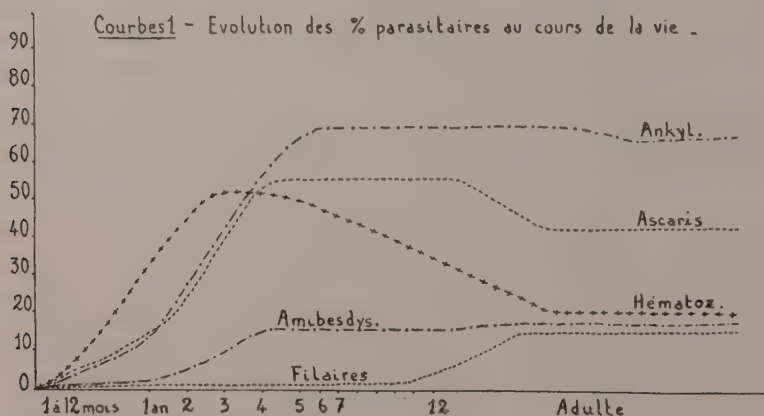
#### Filaires.

Deux espèces se rencontrent : *Loa loa* et *Acanthocheilonema perstans*, avec nette prédominance de cette dernière espèce. Chez

l'adulte, nous avons trouvé environ 10 à 15 p. 100 de porteurs de microfilaires. Le pourcentage minimum est atteint à Bacongo avec 1 p. 100 ; 13 p. 100 à Poto-Poto et plus de 20 p. 100 à Ouenzé. Fait qui nous semble curieux, sur environ 1 100 examens de sang pratiqués chez l'enfant, dont plus de 300 à frais, nous n'avons décelé que 2 cas positifs, chez 2 garçons d'une douzaine d'années.

### REPRÉSENTATIONS GRAPHIQUES.

Sur le graphique (courbes 1), une série de courbes de fréquence indique l'évolution des différentes parasitoses à amibes dysentériques, ascaris, ankylostomes, hématozoaires et filaires. En ordon-

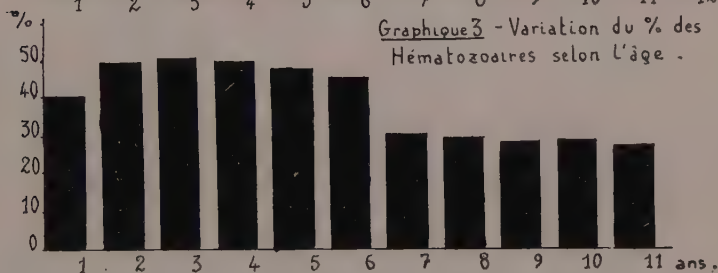
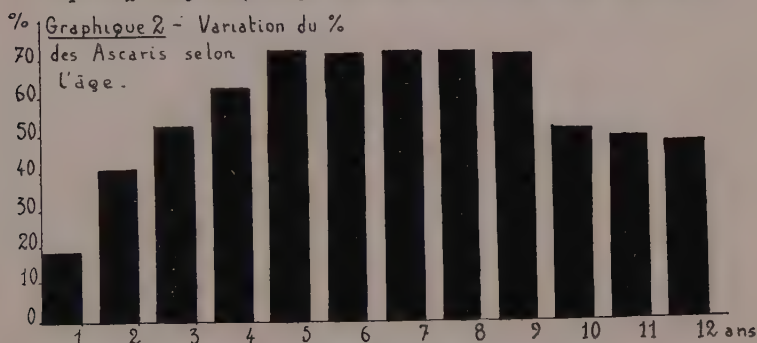
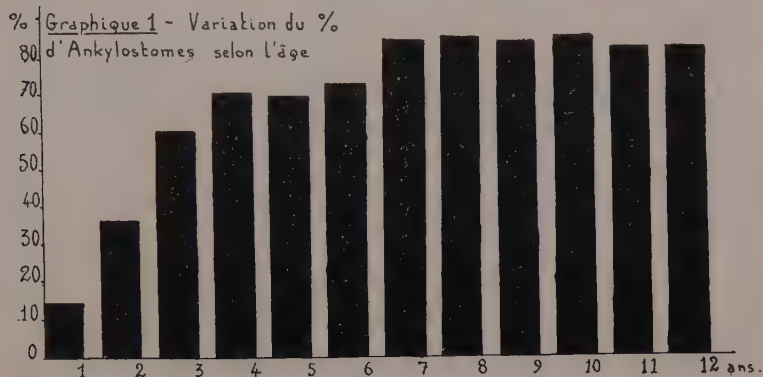


nées sont portés les pourcentages, en abscisses l'âge des sujets, en indiquant, d'abord, les 12 premiers mois, puis les années de 1 à 12 et l'adulte.

Nous remarquons, pour toutes les parasitoses intestinales, la brusque montée des pourcentages à partir d'un an environ, alors que, dans le paludisme, la montée commence plus tôt. Un optimum en plateau s'établit et se poursuit pendant une période plus ou moins longue de l'enfance, puis la stabilisation, après décroissance, se réalise chez l'adulte.

Pour le paludisme, nous avons étudié, sur 828 enfants, la répartition du pourcentage des cas positifs selon l'âge (graphique 3) : dès la première année, 40 p. 100 des enfants sont paludéens ; de 1 à 2 ans, 50 p. 100 ; de 2 à 3 ans, l'optimum de 52 p. 100 est atteint, puis un plateau se maintient à 45 p. 100, jusque vers 6 ans et, ensuite, le taux d'infection baisse à 30 p. 100, pour rejoindre les 20 p. 100 de l'adulte.

Pour les Ankylostomes (graphique 1) et les Ascaris (graphique 2), sur un ensemble de plus de 500 enfants, allant de la naissance à 12-13 ans, la répartition des cas positifs, en fonction



de l'âge, s'établit ainsi qu'il est indiqué sur les graphiques 3 et 4 : l'optimum de l'ankylostomiase n'est pas réalisé avant l'âge de 6 ou 7 ans, où il atteint 84 p. 100 et se prolonge en plateau jusque vers 14-15 ans. Pour l'ascaridiose, l'optimum est également réalisé vers 6-7 ans, où il atteint, environ, 72 p. 100, mais se prolonge pendant moins longtemps.

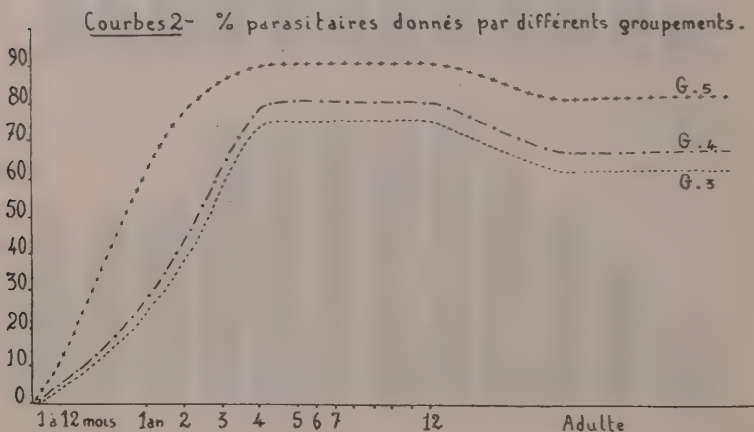
## CONCLUSIONS.

Nous avons jugé intéressant et instructif de donner, en conclusion, en un tableau V et un graphique (courbes 2), les pourcentages que l'on obtient en groupant les parasites pathogènes de différentes façons :

1° Le pourcentage des sujets porteurs d'au moins un protozoaire intestinal, pathogène ou non. Nous obtenons un taux moyen de 20 p. 100, pour l'ensemble des enfants, avec un optimum de 26 p. 100 au-dessus d'un an et 22 p. 100 pour l'ensemble de la population.

2° Le pourcentage des sujets porteurs d'au moins une espèce d'helminthes intestinaux, ce qui donne :

65 p. 100, environ, de parasités, pour l'ensemble des enfants



et l'ensemble de la population, avec 28 p. 100 chez les enfants au-dessous d'un an et 76 p. 100 chez ceux de plus d'un an.

3° Le pourcentage des sujets porteurs soit d'*Ascaris*, soit d'*Ankylostomes*, ou des deux à la fois, ce qui donne :

63,5 p. 100 de l'ensemble des enfants, avec 25 p. 100 chez ceux de moins d'un an et 74,6 p. 100 au-dessus d'un an ;

63 p. 100, pour l'ensemble de la population.

En comparant les chiffres des groupements n°s 2 et 3, on s'aperçoit que les pourcentages sont peu différents, ce qui prouve que les *Ascaris* et les *Ankylostomes* constituent, à eux seuls, le gros des infestations à Helminthes.

4° Le pourcentage des sujets présentant soit amibes dysentériques, *Giarda*, *Ascaris*, ou ankylostomes, ou plusieurs à la fois, ce qui donne :

67 p. 100, pour l'ensemble des enfants, avec 25 p. 100 chez



TABLEAU V. — Étude de divers groupements de parasites.

GROUPEMENTS	LOCALITÉS	Enfants au-dessous de 1 an			Enfants au-dessus de 1 an			Ensemble des Enfants			Adultes			Ensemble de la population		
		+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%	+	0	%
N°1 Protozoaires	Poto-Poto	1	59	1,6	45	142	235	46	201	18,6	53	196	21,2	99	397	1,9
	Bacongo	1	48	2	38	97	281	39	145	21,1	19	61	23,6	58	147	28,2
	Ouenzé	1	15	6,2	28	76	26,8	29	91	24,1	24	48	33,3	53	139	27,6
	Total	3	122	2,3	111	315	26	114	437	20	96	305	24	210	742	22
	Poto-Poto	23	37	38,3	141	46	75,1	164	83	67,4	139	110	55,9	303	193	61,2
N°2 Helminthes	Bacongo	6	43	12,2	97	38	71,8	103	81	52,7	62	18	77,5	165	99	62,6
	Ouenzé	6	10	37,5	87	17	83,7	93	27	72,4	61	11	84,7	154	38	80,1
	Total	35	90	28	325	101	76,2	360	191	65,9	262	139	63	622	330	65
	Poto-Poto	19	41	31,5	139	48	74,5	158	89	66,7	129	120	51,7	287	209	57,9
	Bacongo	6	43	12,2	95	40	63	101	83	54,9	62	18	77,4	163	101	61,7
N°3 Ascaris Ankylostomes	Ouenzé	6	10	37,3	84	20	81	90	30	75	59	13	83,6	149	43	77,7
	Total	31	94	24,9	318	108	74,6	349	202	63	250	151	64,4	599	353	62,2
	Poto-Poto	19	41	31,6	150	37	80,1	169	78	68,4	142	107	57	311	185	62,9
	Bacongo	6	43	12,2	101	34	74,9	107	77	57,9	66	15	53,2	173	92	65,4
	Ouenzé	6	10	5,7	88	16	84,7	94	26	72,4	59	13	82	153	39	79,6
N°4 E. dysenteriae Giardia Ascaris Ankylostomes	Total	21	94	12,9	339	87	79,4	360	181	66,5	267	135	65,6	627	316	66,6
	Poto-Poto	50	37	57,5	202	22	96,2	252	59	81	169	48	78	421	107	80
	Bacongo	48	28	63,2	135	12	91,7	183	40	82	66	8	83,7	249	48	96,8
	Ouenzé	6	11	35,2	91	12	88,2	97	23	80,7	61	13	82,5	158	36	81,6
	Total	104	76	57,7	428	46	90,3	532	122	81,4	296	69	81,2	828	191	82,5
N°5 E. dysenteriae Giardia Ascaris Ankylostomes Plasmodium	Poto-Poto	50	37	57,5	202	22	96,2	252	59	81	169	48	78	421	107	80
	Bacongo	48	28	63,2	135	12	91,7	183	40	82	66	8	83,7	249	48	96,8
	Ouenzé	6	11	35,2	91	12	88,2	97	23	80,7	61	13	82,5	158	36	81,6
	Total	104	76	57,7	428	46	90,3	532	122	81,4	296	69	81,2	828	191	82,5

l'enfant au-dessous d'un an, et un optimum de 80 p. 100 chez l'enfant de plus d'un an ;

66 p. 100, pour l'ensemble de la population.

5° Enfin, le pourcentage des sujets présentant l'un au moins des parasites suivants : Amibes dysentériques, *Giardia*, *Ascaris*, Ankylostomes ou Hématozoaires. Ceci donne :

81,3 p. 100 de parasites pour l'ensemble des enfants, avec 60 p. 100 chez l'enfant de moins d'un an et un optimum de plus de 90 p. 100 chez les enfants de plus d'un an ;

81 p. 100 chez l'adulte ;

82 p. 100, pour l'ensemble de la population.

Ajoutons que, pour ces groupements, nous n'avons tenu compte que des résultats d'un seul examen coprologique et sanguin, pour faciliter les calculs, ce qui, d'ailleurs, n'influence guère les résultats généraux, étant donné que nous avons très souvent affaire à un polyparasitisme. Si nous en tenions compte, nous arriverions, dans le cas du groupement n° 5, à un chiffre voisin de 100 p. 100, ce qui signifie que, pratiquement, aucun enfant de plus d'un an n'échappe, *au minimum*, à une parasitose à amibes dysentériques, ascaris, ankylostomes, ou au paludisme et, très souvent même, est *polyparasité*, compte non tenu des trypanosomés éventuels.

En comparant, chez l'enfant au-dessous et au-dessus d'un an et chez l'adulte, les pourcentages des parasites de chaque espèce pathogène, avec les pourcentages correspondants trouvés dans les différents groupements, on s'aperçoit que les pourcentages augmentent plus chez l'enfant au-dessous d'un an et chez l'adulte que chez l'enfant au-dessus d'un an. Ceci illustre le fait que :

L'enfant au-dessous d'un an est *encore peu parasité* et que les différentes espèces parasites s'additionnent dans le calcul par groupements.

L'enfant au-dessus d'un an est *hyperparasité*, il héberge souvent 2, 3 et même 4 espèces pathogènes à la fois, si bien que le pourcentage du groupement ne varie guère par rapport aux pourcentages des parasites séparés.

Quant à l'adulte, il est *déjà moins parasité*, ayant perdu quelques-uns des parasites de l'enfance, en particulier Ascaris et Hématozoaires.

# PHYSIOLOGIE DES ACTINOMYCÈTES AÉROBIES PATHOGÈNES

## I. — EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

par F. MARIAT (\*).

(Institut Pasteur,  
Service de Mycologie et de Physiologie végétale.)

De nombreux travaux sont consacrés à l'étude de la physiologie des actinomycètes aérobies saprophytes, en particulier de ceux qui présentent des propriétés antibiotiques [1, 2, 3]. En revanche, les espèces capables de provoquer des maladies chez l'homme ou l'animal n'ont été que peu étudiées de ce point de vue [4, 5, 6]. Nous avons entrepris l'étude physiologique des actinomycètes pathogènes réunis dans la collection du Service de Mycologie de l'Institut Pasteur. Cette note rend compte des résultats d'expériences préliminaires qui permettront d'orienter notre travail futur.

Dans la liste ci-après, sont donnés les noms des souches étudiées :

NUMÉROS	NOMS
1, 8, 9, 21 . . . . .	<i>Nocardia maduræ.</i>
2 . . . . .	<i>Streptomyces africanus.</i>
3, 10, 16 . . . . .	<i>N. asteroides.</i>
4, 5, 6, 23 . . . . .	<i>S. pelletieri.</i>
7 . . . . .	<i>N. leishmanii.</i>
11 . . . . .	<i>N. lutea.</i>
12 . . . . .	<i>N. tenuis.</i>
13, 14 . . . . .	<i>S. somaliensis.</i>
17 . . . . .	<i>N. farcinica.</i>
18 . . . . .	<i>N. rubra.</i>
20, 22 . . . . .	<i>S. albus.</i>
24 . . . . .	<i>N. polychromogenes.</i>

Sur les milieux usuels, le développement et la morphologie macroscopique de ces actinomycètes sont très variables. C'est ainsi que l'aspect des colonies est modifié suivant que la culture est effectuée sur gélose ordinaire, sur gélose Sabouraud maltosée.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 décembre 1953.

ou sur extrait de malt gélosé. *Streptomyces somaliensis*, par exemple, fournit sur gélose ordinaire des colonies non pigmentées et de faible développement ; sur gélose Sabouraud, en revanche, le développement est abondant et les colonies pigmentées en noir ou brun noir ; sur malt gélosé il n'y a aucun développement. Les diverses modifications observées dans la morphologie macroscopique des souches cultivées dépendent, dans ces conditions, de nombreux facteurs qu'il sera intéressant de préciser. Ceci est vrai, en particulier, pour les pigments synthétisés sur chacun des milieux.

#### NUTRITION AZOTÉE.

La nutrition azotée des souches en expérience est tout d'abord étudiée en utilisant le milieu de base suivant :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,54 g ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,66 g ;  $\text{MgSO}_4$ , 0,60 g ; KCl, 2,50 g ; glucose pur, 3,0 g ; solution d'oligoéléments, X gouttes ; gélose lavée, 15,0 g ; thiamine, 0,0001 g ; riboflavine, 0,0001 g ; pyridoxine, 0,0001 g ; pantothénate de Ca, 0,0001 g ; acide nicotinique, 0,0001 g ; inositol, 0,001 g ; biotine, 0,000 001 g ; eau distillée dans le verre Pyrex, 1 000 g (pH du milieu, 7,1). Ce milieu est divisé en cinq groupes. Chacun de ces groupes reçoit comme source d'azote l'un des composés ou mélange de composés suivants :

Milieu I :  $\text{KNO}_3$ , 0,1 p. 100.

Milieu II :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 p. 100.

Milieu III : asparagine, 0,1 p. 100.

Milieu IV : hydrolysate de caséine, 1 p. 100.

Milieu V : mélange à raison de 0,001 p. 100 de chacun des composés ci-après : créatine, uracile, adénine, guanosine, uridine, alloxane, adénosine, thymine, xanthine, acide urique, guanine.

Les différentes souches sont ensemencées sur chacun des milieux ainsi constitués. Les résultats notés après trente-six jours de culture à 25° sont résumés dans le tableau I.

Les actinomycètes cultivés peuvent être groupés selon leur besoin en azote. Certains se développent en présence d'un quelconque aliment azoté, minéral ou organique, par exemple *N. asteroides* souche 10. Beaucoup préfèrent l'azote organique et en particulier l'hydrolysate de caséine ; ils font preuve cependant d'un développement plus ou moins limité en présence d'azote inorganique (*N. farcinica* souche 17). *Nocardia tenuis*, agent de la trichomycose axillaire, exige l'azote de l'hydrolysate de caséine pour se développer. Ce microorganisme, isolé pour la première fois par Castellani [7], est donné comme vivant en symbiose avec une bactérie coccoïde.

Les changements d'aliment azoté entraînent, chez certaines souches, des modifications de la pigmentation.



TABLEAU I

N°	N O M S	MILIEU I		MILIEU II		MILIEU III		MILIEU IV		MILIEU V	
		D	pigment	D	pigment	D	pigment	D	pigment	D	pigment
3	N. asteroides	±	jaune	±	jaune	±	jaune	+	jaune	±	jaune
10	-id-	+	brun jaune	+	rosé	+	non pigmenté	+	jaunâtre	+	blanchâtre
16	-id-	+	non pigmenté	±	rosé orangé	+	non pigmenté	+	brun jaune	+	non pigmenté
4	S. pelletieri	±	corail	±	corail	±	corail	+	corail	±	corail
5	-id-	±	corail	±	corail	+	corail	+	corail	±	corail
7	N. leishmanii	+	rosé	±	rosé	+	rosé	+	rose corail	±	blanc
8	N. maduræ	+	non pigmenté	±	non pigmenté	+	non pigmenté	+	non pigmenté	+	non pigmenté
9	-id-	+	non pigmenté	±	non pigmenté	+	non pigmenté	+	non pigmenté	+	non pigmenté
11	N. lutea	±	rouge orangé	±	rouge orangé	±	rouge orangé	+	rouge orangé	±	rouge orangé
12	N. tenuis	0		0		0		+	orangé	0	
13	S. somaliensis	0		0		+	non pigmenté	+	non pigmenté	±	non pigmenté
14	-id-	±	non pigmenté	±	non pigmenté	+	non pigmenté	+	non pigmenté	±	non pigmenté
17	N. farcinica	±	non pigmenté	±	non pigmenté	+	non pigmenté	+	non pigmenté	+	non pigmenté
18	N. rubra	±	rouge orangé	±	rouge orangé	±	rouge orangé	+	rouge orangé	±	rouge orangé
20	S. albus	+	blanc mat	±		+	blanc mat	+	jaune brillant	±	
22	-id-	±	non pigmenté	±	non pigmenté	+	non pigmenté	+	non pigmenté	±	non pigmenté
24	N. polychromogenes	±	rose saumon	±	rose saumon	±	rose saumon	+	rose saumon	±	rose saumon

Développement (D) et pigmentation de divers actinomycètes en présence de différentes sources d'azote : I :  $\text{KNO}_3$  ; II :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ; III : asparagine ; IV : hydrolysât de caséine ; V : mélange de divers composés azotés (bases puriques, bases pyrimidiques, etc.). Milieu de base glucosé. (0 = aucun développement ; ± = développement faible ; + = développement moyen à abondant).

Au cours d'une seconde série d'expériences, les composés suivants sont ajoutés au milieu de base cité plus haut mais privé de son glucose.

Milieu VI : glucose, 1 p. 100 +  $\text{KNO}_3$ , 0,1 p. 100.

Milieu VII : glucose, 1 p. 100 + hydrolysât de caséine, 1 p. 100.

Milieu VIII : maltose, 1 p. 100 +  $\text{KNO}_3$ , 0,1 p. 100.

Milieu IX : maltose, 1 p. 100 + hydrolysât de caséine, 1 p. 100.

Milieu X : hydrolysât de caséine, 1 p. 100.

Milieu XI : asparagine, 0,1 p. 100.

Les milieux ainsi obtenus sont ensemencés avec les différentes souches. Les observations notées après trente-huit jours de culture à 25° sont résumées dans le tableau II. Les observations concernant le milieu XI (asparagine) ne sont pas mentionnées, aucun développement ne s'étant produit.

L'asparagine utilisée comme unique aliment azoté et carboné ne permet aucune croissance des actinomycètes étudiés. En revanche, comme l'indique le tableau II, l'hydrolysât de caséine est, dans la majorité des cas, utilisé comme seule source d'azote et de carbone. On remarque, par ailleurs, que le glucose est, d'une façon générale, mieux utilisé que le maltose. La qualité de l'aliment carboné intervient, tout comme celle de l'aliment azoté dans l'aspect macroscopique des cultures.

TABLEAU II

N°	N.C.M.S.	MILIEU VI	MILIEU VII	MILIEU VIII	MILIEU IX	MILIEU X
		D pigment	D pigment	D pigment	D pigment	D pigment
1	N. maduræ	±	±	±	±	±
6	-id-	+ blanchâtre	+ blanchâtre	± blanchâtre	+ rosé	+ blanchâtre
9	-id-	± non pigmenté	+ non pigmenté	± rosé	+ rosé	+ non pigmenté
21	-id-	± non pigmenté	+ jaunâtre	+ d. blanchâtre	+ d. blanc-rosé	± incolore
2	J. africanus	± rouge corail	+ rose corail	± rouge rosé	+ jaune saumoné	+ jaune saumoné
3	N. asteroides	+ jaunâtre	+ jaunâtre	± d. blanc	+ orangé d. blanc	+ duvet blanc
10	-id-	+ brun jaune	+ jaunâtre		± blanchâtre	± blanchâtre
16	-id-	+ peu pigmenté	+ jaunâtre	±	± blanchâtre	+ blanchâtre
4	S. pelletieri	± corail	+ corail d. blanc		+ rose d. blanc	+ duvet blanc
5	-id-	± corail	+ corail	±	+ rose d. blanc	+ rose d. blanc
6	-id-	± jaunâtre	+ rose orangé	±	+ jaunâtre	+ jaunâtre
23	-id-	± jaune	± jaunâtre	± jaunâtre	+ jaunâtre	± jaunâtre
7	N. leishmanii	+ d. rosé	+ corail d. rosé	+ d. blanc-rosé	+ duvet rosé	+ duvet rosé
11	N. lutea	± rouge orangé	+ rouge orangé	± rouge orangé	+ rouge orangé	+ rouge orangé
12	N. tenuis	0	+ orangé	0	+ orangé	0
13	S. somaliensis	0	+ non pigmenté	0	+ non pigmenté	±
14	-id-	0	+ non pigmenté	0	± non pigmenté	±
17	N. farcinica	± non pigmenté	+ duvet blanc	±	+ duvet blanc	± duvet blanc
18	N. rubra	± rouge orangé	+ rouge orangé	± rouge orangé	+ rouge orangé	± rouge orangé
20	S. albus	+ blanc mat, d.	+ jaune d. blanc	+ duvet blanc	+ duvet blanc	± duvet blanc
22	-id-	± non pigmenté	+ non pigmenté	± non pigmenté	+ duvet blanc	+ duvet blanc
24	S. polychromogenes	± rose saumon	+ rose saumon	±	+ rose jaune	±

Développement (D) et pigmentation de divers actinomycètes en présence de différents composés ou mélanges de composés comme aliments azotés et carbonés. VI : glucose +  $\text{KNO}_3$ ; VII : glucose + hydrolysât de caséine; VIII : maltose +  $\text{KNO}_3$ ; IX : maltose + hydrolysât de caséine; X : hydrolysât de caséine (0 = aucun développement; ± = développement faible; + = développement moyen à abondant; d = duvet).

#### BESOINS EN VITAMINES.

Les exigences éventuelles en vitamines des actinomycètes sont recherchées en cultivant les microorganismes sur des milieux synthétiques privés intentionnellement d'une vitamine déterminée. Le milieu de base suivant est utilisé :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,54 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,66 g;  $\text{MgSO}_4$ , 0,60 g;  $\text{KCl}$ , 2,50 g; glucose pur, traité par le charbon activé, 3,0 g; solution d'oligoéléments, X gouttes; gélose lavée, 15,0 g (seulement pour les milieux solides); eau distillée dans le verre Pyrex, 1 000 g (pH du milieu, 7,1). Ce milieu constitue le milieu témoin « minimum ». Le milieu « maximum » est ce milieu de base additionné des vitamines suivantes : thiamine, riboflavine, pyridoxine, acide nicotinique, pantothénate de calcium (0,0005 g/l), inositol (0,005 g/l) et biotine (0,000 005 g/l). Les autres milieux sont le milieu « minimum » auquel on a ajouté toutes les vitamines citées ci-dessus moins celle dont on désire étudier l'action éventuelle.

Il est ainsi possible de démontrer que seules parmi toutes les souches cultivées, les espèces *Nocardia lutea* et *N. rubra* ne peuvent se développer sur le milieu « minimum » ni sur aucun

des milieux où la thiamine est absente. Ces deux organismes exigent la vitamine B<sub>1</sub> pour se développer ; ils sont incapables d'en réaliser la synthèse.

#### POUVOIR ANTIBIOTIQUE DES ACTINOMYCÈTES ÉTUDIÉS.

Par la méthode des stries sur boîte de Petri, le pouvoir antibiotique éventuel des diverses souches est essayé envers *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Eberthella typhi*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. De toutes les souches essayées, seul *Nocardia maduræ* n° 21 fait preuve d'une activité antibiotique remarquable. Elle s'est exercée contre *S. aureus*, *B. subtilis* et *C. albicans*. De nouveaux essais devaient montrer qu'une semblable action s'exerce très nettement contre les champignons pathogènes suivants : *Candida albicans* (souche 104), *C. krusei* (souche 85), *C. tropicale* (souche 43), *Cryptococcus neoformans* et *Trichosporon rotundatum*. L'étude de cet intéressant produit du métabolisme de ce *N. maduræ* se poursuit et des résultats plus complets seront donnés ultérieurement.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

La qualité de l'alimentation azotée et carbonée influe sur la croissance, la pigmentation et la morphologie macroscopique des actinomycètes aérobies pathogènes étudiés (voir tableaux I et II). Certains d'entre eux se développent indifféremment en présence d'une source d'azote minéral ou organique (*N. asteroides* 10 et 16, *N. leishmanii* 7, *N. maduræ* 8 et 9). D'autres marquent une préférence pour, ou utilisent exclusivement, l'azote de l'asparagine ou de l'hydrolysate de caséine (*S. somaliensis* 13 et 14, *S. pelletieri* 5, *N. lutea* 11, *N. farcinica* 17, *N. rubra* 18, *S. albus* 22). *Nocardia tenuis* enfin ne fournit de développement que lorsque le milieu contient de l'hydrolysate de caséine.

Le glucose est, d'une façon générale, mieux utilisé que le maltose (tableau II). L'asparagine ne peut servir d'unique aliment azoté et carboné, alors qu'au contraire l'hydrolysate de caséine peut, pour de nombreuses souches, remplir ce rôle.

*N. rubra* et *N. lutea* exigent la thiamine pour se développer. Leur morphologie macroscopique et microscopique, leur pigmentation, leurs caractères physiologiques particuliers militent pour leur réunion au sein d'une même espèce dont ils pourraient, tout au plus, constituer des variétés.

*N. maduræ* souche 21 produit une substance brune qui diffuse dans la gélose et possède une activité antibiotique remarquable envers *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicale*, *Trichosporon rotundatum* et *Cryptococcus neoformans*.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. PERLMAN. *Bot. Rev.*, 1953, **19**, 46.
- [2] D. GOTTLIEB. *VI<sup>e</sup> Congrès intern. Microb.*, Rome, 1953. Symposium Actinomycétales, p. 122.
- [3] W. J. NICKERSON et R. RAM MOHAN. *VI<sup>e</sup> Congrès intern. Microb.*, Rome, 1953, Symposium Actinomycétales, p. 137.
- [4] S. A. WAKSMAN. *J. inf. Dis.*, 1918, **23**, 547.
- [5] S. A. WAKSMAN. *J. Bact.*, 1919, **4**, 189 et 1920, **5**, 1.
- [6] S. A. WAKSMAN. *The Actinomycetes*, Chronica Botanica, Waltham, 1950.
- [7] A. CASTELLANI. *Brit. J. Derm. Syphil.*, 1911, **23**, 341.



# SPOROTRICHOSE EXPÉRIMENTALE DU HAMSTER.

## OBSERVATION DE FORMES ASTÉROÏDES

### DE *SPOROTRICHUM*

par F. MARIAT et E. DROUHET (\*.)

(Institut Pasteur,  
Service de Mycologie et de Physiologie végétale.)

Le hamster doré s'est révélé être un animal de laboratoire extrêmement utile pour l'étude des maladies infectieuses difficilement reproductibles. C'est ainsi que de jeunes hamsters mâles sont utilisés pour l'étude de l'actinomycose expérimentale à *Actinobacterium israeli* [1, 2]. Les maladies humaines ou animales provoquées par des champignons sont quelquefois difficiles à reproduire chez les animaux de laboratoire. Le hamster devait se montrer extrêmement utile dans ce domaine. Drouhet et Segretain [3] provoquent chez ce petit rongeur une histoplasmose caractéristique. Ils étudient par ailleurs [4] sur cet animal le résultat spectaculaire de l'inoculation de *Blastomyces dermatitidis* et de *Paracoccidioides brasiliensis*.

★ ★

L'inoculation de *Sporotrichum schencki*, agent de la sporotrichose humaine et animale, provoque aisément chez les animaux de laboratoire, et plus spécialement chez le rat blanc mâle, une maladie fréquemment généralisée. Les animaux mâles présentent des orchites importantes. Des lésions gommeuses sous-cutanées ne sont que rarement obtenues et seulement par inoculation traumatique de la peau, comme l'a fait en particulier Baker sur la souris [5].

L'inoculation au hamster jeune, par voie intrapéritonéale, de formes levures [6] ou de conidies de *Sporotrichum schencki* (souche isolée lors de l'épidémie du Transvaal) devait provoquer chez cet animal l'apparition de lésions gommeuses sous-cutanées exactement comparables à la sporotrichose spontanée. La forme la plus fréquente de cette maladie chez l'homme est en effet carac-

(\*) Société Française de Microbiologie. Séance du 7 janvier 1954.

térisée par des gommages sous-cutanées localisées le long des cordons lymphatiques. Nous avons tout d'abord pensé qu'un traumatisme des pattes des animaux sur le fond grillagé des cages aidait à la manifestation de ce syndrome. Cependant la répétition des inoculations sur des animaux élevés en bocaux de verre devait, dans la majorité des cas, conduire à l'apparition de gommages sporotrichosiques sur les pattes. Une généralisation de la maladie est observée dans un certain nombre de cas.

Les hamsters inoculés (voie intrapéritonéale 0,5 cm<sup>3</sup> de suspension riche de formes levures ou de conidies), peuvent présenter deux types d'affection : a) une forme chronique avec gommages sous-cutanées et ostéo-articulaires des pattes et, chez les animaux mâles, une orchite (planche I, fig. 1) ; b) une forme généralisée.

L'apparition de lésions sur les pattes s'observe environ un mois après l'inoculation. On note tout d'abord une tuméfaction des pattes (planche I, fig. 2, a et b) ; la peau et les tissus sous-jacents sont œdématisés ; la tuméfaction peut intéresser toute la région de l'articulation tibio-tarsienne ou n'être qu'une simple gomme sous-cutanée localisée à la face inférieure des pattes. Les os du tarse et de l'extrémité tibiale inférieure sont irrégulièrement hypertrophiés et la marche de l'animal est malaisée. Les gommages sous-cutanées et ostéo-articulaires s'ulcèrent rarement, mais le fait se présente cependant. L'ouverture des gommages laisse alors sourdre un pus épais contenant le champignon.

Chez le hamster mâle, l'apparition des lésions des pattes est précédée ou suivie de lésions testiculaires. Les testicules sont tuméfiés, grossissent jusqu'à prendre le volume d'une noix et l'animal se traîne péniblement. L'orchite devient suppurante et se fistulise à la peau en un délai plus ou moins long, de l'ordre de trois semaines.

A côté de ces formes qui peuvent rester stationnaires pendant plusieurs mois on observe des formes généralisées mortelles, surtout lorsqu'il s'agit de très jeunes animaux inoculés avec la forme levure du champignon. Dans ce cas, au tableau décrit plus haut, s'ajoute la cachexie.

A l'autopsie des animaux présentant la forme chronique de la maladie, on ne constate pas, au moins macroscopiquement, d'atteinte des autres organes. Les testicules énormes présentent à leur surface de nombreuses granulations et des nodules de formes variées. A l'ouverture de ces nodules s'écoule un pus très épais contenant le champignon.

Dans le cas de sporotrichose généralisée on observe, en plus des nodules péritonéaux, une congestion du foie et des reins, une légère augmentation de la rate et une congestion pulmonaire diffuse.

L'ensemencement de pus (forme chronique) ou de fragments d'organes (forme généralisée mortelle) permet d'obtenir des cultures pures de *Sporotrichum schencki*.

★ ★

L'étude anatomo-pathologique des différents organes permet les observations suivantes : les testicules sont totalement envahis par une zone d'infiltration principalement à polynucléaires avec cependant quelques cellules plasmatiques. On observe de nombreux abcès où un parasite centre une zone à polynucléaires. La lésion présente l'aspect d'un granulome avec une zone centrale nécrosée. L'invasion progresse de l'intérieur vers l'extérieur et les tubes séminifères sont le plus souvent respectés. Les parasites observés dans les testicules ne présentent que rarement leur forme classique « en navette », mais plutôt la forme de grains massués ou de grosses cellules rondes à membrane épaisse. Ils sont assez peu nombreux.

Le foie présente fréquemment des vaisseaux hypertrophiés accompagnés de foyers hémorragiques. On constate des zones d'infiltration à polynucléaires qui, suivant l'état de l'animal malade, sont plus ou moins nombreuses et importantes. Chez les animaux présentant la forme chronique de la maladie, il est souvent difficile, voire même impossible, de noter la présence de parasites. Quand ils existent, dans les cas de maladie généralisée par exemple, ils revêtent la forme en navette.

Dans les affections généralisées le rein présente un aspect pathologique avec microabcès. Il renferme alors les parasites, quelquefois en très grand nombre, sous la forme d'éléments arrondis plus ou moins bourgeonnés et qui représentent, comme nous le verrons plus loin, la forme intermédiaire entre la « navette » et le grain massué. Les parasites sont présents jusque dans les glomérules. Comme le rein, la rate ne présente pas d'aspect particulier dans les cas d'affection chronique. Dans les maladies généralisées on note des foyers inflammatoires plus ou moins nombreux.

L'examen des pattes est particulièrement intéressant. Sous la peau, au niveau de l'articulation, débordant sur les deux surfaces osseuses, on constate une zone conjonctive inflammatoire à disposition lobulaire. Les lobules sont constitués d'éléments circulaires disposés irrégulièrement. Ces petites plages sont épithélioïdes, nécrotiques au centre et sont plongées dans un tissu de granulations très riche en plasmocytes et en vaisseaux néoformés, ce qui donne au tissu un aspect folliculaire. On note la présence de microabcès. Autour du parasite qui, le plus souvent, revêt la forme astéroïde, on remarque bien les trois zones de réactions

caractéristiques : zone centrale purulente avec polynucléaires en voie de dégénérescence et pyophages ; zone moyenne avec cellules épithélioïdes et cellules géantes et enfin zone périphérique avec plasmocytes et vascularite.

★★

Nous mentionnons plus haut que *Sporotrichum schencki* revêt dans certaines lésions l'aspect d'un grain massué. C'est la forme astéroïde observée la première fois par Splendore [7] et suffisam-

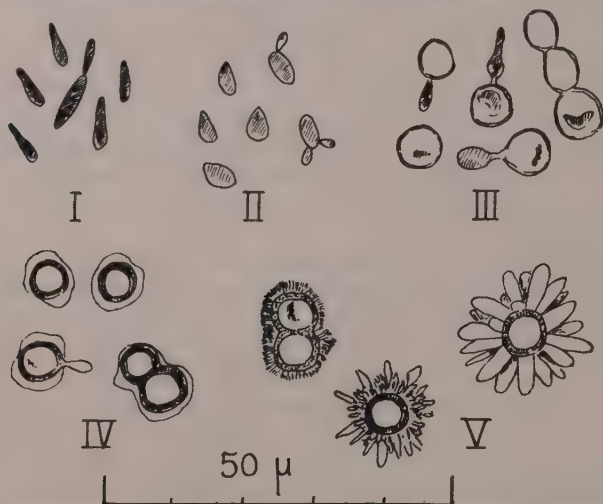


FIG. 4. — Différentes formes de *Sporotrichum schencki* observées dans les tissus du Hamster. I, formes en « navette » ; II, formes ovoïdes renflées ; III, formes rondes à parois minces ; IV, formes rondes à parois épaisses et entourées de substance acidophile ; V, formes astéroïdes à trois stades différents.

ment rare pour que son observation constante dans nos expériences soit à signaler.

La forme parasitaire classique de *Sporotrichum* est un élément plus ou moins allongé ou arrondi et capable de bourgeonner (fig. 1, I). C'est la « conidie-levure » ou la forme dite en « navette » ou en « cigare » ; ces éléments sont colorés intensément par le Gram ; ils restent colorés après la réaction de Hotchkiss à l'acide périodique-Schiff. Les éléments en navette sont fréquemment entourés d'un halo clair donnant l'impression d'une capsule ; les parasites sont en général assez nombreux dans les organes des animaux inoculés expérimentalement. Ils mesurent de 1 à 3  $\mu$  de large sur 2 à 5  $\mu$  de long et sont isolés ou par groupes plus ou moins importants.

La forme astéroïde (ou grain massué) est représentée le plus



souvent par une cellule ronde, quelquefois bourgeonnée, entourée de massues éosinophiles plus ou moins bien formées (fig. 1, V ; planche I, fig. 4 et 5). Cet élément massué ressemble alors étrangement au grain actinomycosique. L'intérieur de la cellule centrale est coloré en bleu rosé par le May-Grünwald-Giemsa et est délimité par une membrane plus ou moins épaisse, colorée plus ou moins intensément.

Outre la forme classique en navette et le grain massué, on note différentes formes du parasite qui, insensiblement, conduisent de celle-là à celui-ci. Ce sont, à peu de chose près, ces mêmes formes qui sont signalées par les auteurs sud-africains [8] et qui marquent les étapes d'un cycle évolutif du parasite *in vivo*.

C'est tout d'abord, après la forme en navette, un élément plus arrondi (fig. 1, II), prenant les colorants avec moins d'intensité et dont la morphologie est tout à fait comparable à celle des formes levures obtenues *in vitro* [6]. Le stade suivant est représenté par une cellule parfaitement ronde de 5 à 10  $\mu$  de diamètre, à paroi en général mince (fig. 1, III ; planche I, fig. 3). Lorsque l'on distingue le noyau, celui-ci est diffus ou contourné en croissant. Ces cellules sont le plus souvent isolées mais quelquefois groupées par deux ou trois éléments rattachés par un isthme étroit et prennent alors un aspect en haltère ou moniliforme. On observe des éléments en « navette » qui bourgeonnent directement en formes arrondies. Ultérieurement la paroi des éléments arrondis épaissit et apparaît nettement à double contour. Eventuellement cette forme pourrait être considérée comme une chlamydospore semblable à celles qui peuvent être observées dans les vieilles cultures de *Sporotrichum* (fig. 1, IV). Les parasites s'entourent d'une substance acidophile et acido-résistante pouvant avoir 1 à 2  $\mu$ , quelquefois plus, d'épaisseur. Dans quelques cas, la substance ne cerne qu'imparfaitement la cellule. Par la suite, au sein de cette masse acidophile, se dessinent de fines stries radiales qui se différencient dans toutes les directions de l'espace, en massues plus ou moins allongées et volumineuses. L'extrémité de chaque massue peut être mousse ou pointue. La longueur de chaque massue est, généralement, égale au demi-diamètre de la cellule ; elles peuvent mesurer de 0,5 à 3  $\mu$ , quelquefois 4  $\mu$  de diamètre. Certains grains particulièrement importants atteignent de 20 à 30  $\mu$  de diamètre total. Le diamètre de la cellule pouvant aller de 10 à 15  $\mu$ . Les massues de ces gros grains peuvent mesurer de 6 à 15  $\mu$  de long. La couronne de massues se détache quelquefois de la cellule centrale et semble d'une grande fragilité.

Les grains massués se rencontrent en nombre moins important que les éléments en navette ou que les éléments arrondis. Nous ne les avons observés que dans les pattes et dans les testicules où



ils existent presque exclusivement avec quelques cellules enrobées de substance acidophile.

★ ★

Comme nous le disions plus haut, les formes massuées ont été signalées pour la première fois par Splendore en 1908 dans un cas de sporotrichose humaine [7]. C'est cet auteur qui a donné le nom de « forme astéroïde » à ces éléments massués. Il a même créé une espèce particulière de *Sporotrichum*, *S. asteroides* ramenée plus tard, par Matruchot, de Beurmann et Gougerot qui en complètent l'étude, à une simple variété de *S. beurmanni* [9]. La reproduction expérimentale de formes astéroïdes a été, semble-t-il, facilement obtenue. En 1908 également, Greco décrit des formes massuées chez l'homme et chez le rat [10]. Harter et Gruyer en France obtiennent également chez le cobaye des formes astéroïdes [11]. Davis [12] signale un arrangement radié des éléments sporotrichosiques mais, à notre avis, sans aucune similitude avec les grains massués. Talice [13] seul et avec MacKinnon [14] signale des éléments massués dans plusieurs cas de sporotrichose humaine. En 1946 Moore et Ackerman [15] constatent la présence de formes massuées dans les coupes d'une lésion gommeuse de sporotrichose humaine. Il semble que ce soit le premier cas spontané de sporotrichose présentant des grains astéroïdes signalé en Amérique du Nord.

A cette occasion nous voudrions signaler avec Pinkus et Grekin [16] que, d'une façon générale, les sporotrichoses spontanées ou expérimentales présentant des grains massués ont été fréquemment observées dans l'hémisphère sud et, avec une grande rareté, dans l'hémisphère nord.

L'importante épidémie de sporotrichose du Transvaal en 1941-1943 devait permettre aux auteurs sud-africains de mettre fréquemment en évidence des formes massuées [8]. Ils ont de plus obtenu chez le rat blanc, avec des souches américaines et sud-africaines, non seulement les formes astéroïdes caractéristiques mais également les diverses formes intermédiaires que nous confirmons aujourd'hui.

En 1950 Pinkus et Grekin [16] décrivent le second cas nord-américain de sporotrichose présentant des éléments massués.

Les formes astéroïdes de *Sporotrichum* ne peuvent permettre d'identifier une espèce ni même une variété particulière. On a obtenu, à la suite de cultures effectuées d'après des cas spontanés de sporotrichose présentant des formes astéroïdes, des souches de champignons exactement identifiables (à quelques minimales restrictions près) à *Sporotrichum schencki* ou à *S. beurmanni*. Expérimentalement ces deux espèces ont permis d'obtenir les formes astéroïdes chez les animaux favorables. Il ne s'agit donc

pas d'une morphologie propre à une espèce donnée, mais plutôt provoquée par des conditions particulières qui restent à déterminer.

Les formes massuées de *Sporotrichum* ont été interprétées tour à tour comme étant des formes de dégénérescence ou comme des fructifications d'un type particulier. Ce ne sont pas, à notre avis, des formes de dégénérescence. Elles sont le résultat d'une évolution *in vivo* bien caractérisée et chacune de ces formes, si elle est transportée sur un milieu convenable, donne naissance à un mycélium parfaitement constitué. Ce ne sont pas non plus des organes de fructification dont les massues seraient les spores externes. Ces massues sont extrêmement fragiles et ne possèdent pas les caractères de coloration spécifique des spores.

La disposition radiale en massues n'est d'ailleurs pas le propre du seul *Sporotrichum*. On connaît le grain classique de l'actinomycose. De plus, de nombreuses bactéries : bacilles tuberculeux, staphylocoques [17, 18], actinobacille, différents champignons [14, 19], *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Candida*, etc., et, ce qui est plus particulier, des bacilles tuberculeux tués ou même des corps étrangers (dépôt de tellure) inoculés à l'animal, peuvent provoquer l'apparition de grains massués. Or, quel que soit l'organisme vivant ou mort ou le corps étranger en cause, les massues ont, dans tous les cas, la même disposition, sensiblement les mêmes dimensions et les mêmes caractères de coloration (acido-résistance). Ces faits rejettent l'hypothèse selon laquelle le grain massué serait un organe de fructification ou un élément en voie de dégénérescence. Ils obligent également à abandonner l'ancienne explication de la genèse des massues d'actinomycose d'après laquelle ces dernières seraient le résultat d'un épaississement de la membrane de filaments radiés.

Dans tous les cas d'organismes vivants et en particulier dans le cas du *Sporotrichum*, il nous paraît certain que le grain massué est le résultat d'une réaction de défense. L'accumulation de sécrétions mucoïdes acidophiles autour de la cellule ronde de l'avant-dernier stade, sécrétions aux dépens desquelles se constituent les massues, peut être interprétée comme un mécanisme de protection du parasite [8] ou comme un mécanisme de défense de l'hôte. Il se peut d'ailleurs que le produit mucoïde d'où naissent les massues soit d'origine mixte. Il y a peut-être là un rapprochement à faire avec les inclusions stellaires observées dans les cas de réactions à corps étrangers, mais qui ne s'observent que dans les cellules géantes.

#### RÉSUMÉ.

La sporotrichose expérimentale du hamster doré peut prendre deux aspects : a) un aspect chronique avec lésions gommeuses

des pattes et orchite : b) un aspect généralisé suivi d'une issue fatale.

On observe *in vivo* différentes morphologies de *Sporotrichum* indiquant les étapes d'un cycle évolutif allant de la forme « en navette » classique à la forme astéroïde. Les différentes formes du parasite sont décrites.

Le grain sporotrichosique massué apparaît comme le résultat d'une réaction de défense. Les massues se différencient aux dépens d'une substance mucoïde qui peut être sécrétée soit par le champignon, soit par les tissus de l'hôte, soit enfin par les deux organismes en compétition.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. L. HAZEN, A. J. MARTIN et E. DOGAN. *N. Y. State Departm. Health, Annual Report*, 1947, 78 et 79.
- [2] E. L. HAZEN, G. N. LITTLE et H. RESNICK. *J. Lab. Clin. Med.*, 1952, 40, 914.
- [3] E. DROUHET et G. SEGRETAIN. *Ces Annales*, 1952, 83, 381.
- [4] E. DROUHET et G. SEGRETAIN. Inédit.
- [5] R. D. BAKER. *Am. J. trop. Med.*, 1947, 27, 749.
- [6] E. DROUHET et F. MARIAT. *Ces Annales*, 1952, 83, 506.
- [7] A. SPLENDORE. *Rev. Soc. Sc., Sao Paulo*, 1908, 3, 62.
- [8] F. W. SIMSON, M. A. F. HELM, J. W. BOWEN et F. A. BRANDT. In *Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand*, Johannesburg, 1947.
- [9] L. DE BEURMANN et H. GOUGEROT. *Les Sporotrichoses*, Paris, 1912.
- [10] N. V. GRECO. *Rev. Dermat.*, 1908, 1, 78.
- [11] A. HARTEY et GRUYER. *C. R. Soc. Biol.*, 1909, 66, 399.
- [12] D. J. DAVIS. *J. infect. Dis.*, 1913, 12, 453.
- [13] R. V. TALICE. *Ann. Parasit.*, 1935, 13, 576.
- [14] R. V. TALICE et J. E. MACKINNON. *Proceed. 3rd Intern. Congress Microbiol.* (1939), 1940, 510.
- [15] M. MOORE et L. V. ACKERMAN. *Arch. Dermat. Syphil.*, 1946, 53, 253.
- [16] H. PINKUS et J. W. GREKIN. *Arch. Dermat. Syphil.*, 1950, 61, 813.
- [17] J. MAGROU. Thèse de Médecine, Paris, 1914.
- [18] J. MAGROU. *Ces Annales*, 1919, 33, 344.
- [19] M. MOORE. *Arch. Pathol.*, 1946, 42, 113.

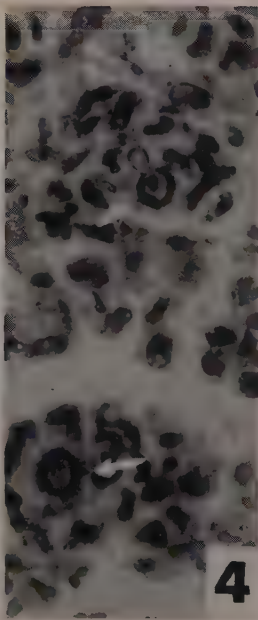
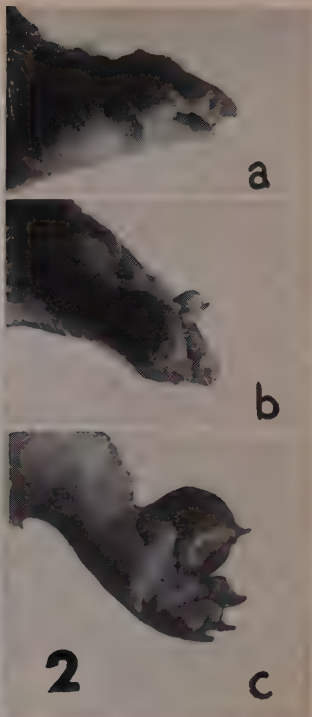
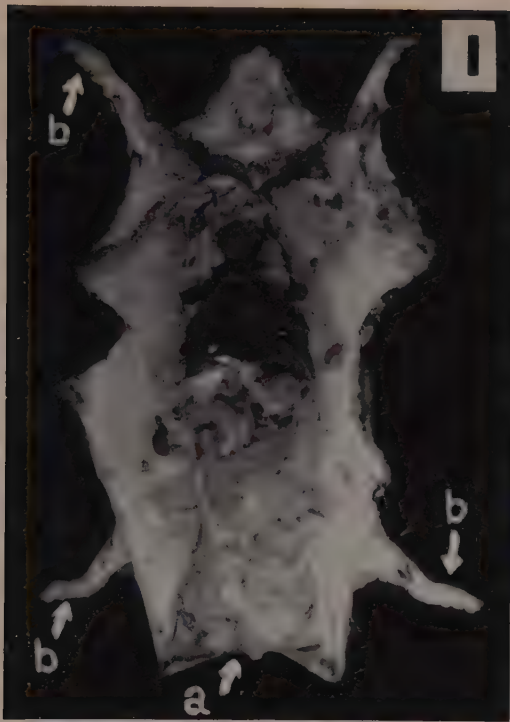
#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

1, autopsie de Hamster à sporotrichose expérimentale chronique ; a, orchite bilatérale avec nodules sporotrichosiques ; b, nodosités des pattes.

2, différents aspects de pattes de Hamster : a et b, nodosités ; c, abcès.

3, différents aspects du parasite, stades I, II et III de la figure 1. Coupe de rein, coloration de Hotchkiss,  $\times 660$ .

4 et 5, aspects du parasite dans un testicule, stades IV et V, coloration de Dominici,  $\times 660$ .







**BACTÉRIES PATHOGÈNES OU SAPROPHYTES  
TRANSFORMANT LE GLUCOSE EN ACIDE GLUCONIQUE  
(*BACTERIUM ANITRATUM*, B 5 W, *MORAXELLA LWOFFI*  
VAR. *GLUCIDOLYTICA*, *NEISSERIA WINOGRADSKYI*)**

par P. VILLECOURT et G. JACOBELLI (\*).

(Institut Pasteur, Service des Fermentations  
et Institut National de la Recherche Agronomique.)

Le nom de *Neisseria winogradskyi* a été utilisé jusqu'ici pour désigner une bactérie décrite en 1952 par Lemoigne et collaborateurs [11]; cette bactérie est très répandue dans le sol et certaines techniques permettent de l'isoler à coup sûr; elle a maintenant fait l'objet d'importants travaux biochimiques [1, 2, 12]. Lors du premier travail bactériologique sur ce germe, il était indiqué que sa position systématique restait incertaine et, à la demande de M. Lemoigne, nous avons entrepris ce travail.

Nous avons été amenés à rapprocher cette bactérie du sol d'un groupe de germes que les médecins ont commencé récemment à décrire. En 1948, Schaub, à Baltimore, décrit avec précision 15 souches isolées de tissus et liquides pathologiques humains [16]; cet auteur ne peut les rattacher à aucun autre genre et il les place en position d'attente sous le nom de *Bacterium anitratum*. Au même moment, Stuart, à Providence, décrit 55 souches « B 5 W » formant un nouveau groupe placé provisoirement dans les Entérobactéries [17]. Des échanges de souches établirent l'identité de *Bacterium anitratum* et B 5 W, et la synonymie de ces termes fut désormais acquise. Le groupe « B 5 W-*Bacterium anitratum* » est à nouveau étudié aux U. S. A. par Ferguson, qui décrit 109 souches en 1949 [8], puis au Danemark par Brooke, qui décrit 86 souches en 1950 [7]. En 1951, Piéchaud décrit en France plusieurs souches qui rentrent dans le groupe « B 5 W-*Bacterium anitratum* », et parmi elles, sans la désigner explicitement, une souche de *Neisseria winogradskyi* que Lemoigne lui avait fourni [14]. Dans ce même travail, Piéchaud compare ce groupe qui attaque certains sucres à *Moraxella lwoffii*, qui

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 décembre 1953.

n'attaque aucun sucre ; il constate une parenté et propose le nom de *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*.

*Neisseria winogradskyi* présente un métabolisme du glucose très caractéristique [1, 12] que nous avons essayé de retrouver en examinant des souches choisies parmi les *Neisseria* et dans le groupe que Piéchaud appelle *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*.

#### TECHNIQUE.

La collection de l'Institut Pasteur nous a fourni 3 souches de *Neisseria* attaquant le glucose : *Neisseria sicca* 52183, *Neisseria perflava* 52180, *Neisseria perflava* 52184. Piéchaud nous a fourni 6 souches de *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* et les indications d'origine reproduites dans le tableau I.

TABLEAU I. — Origine des souches de *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* (Dr Piéchaud).

SOUCHES	INDICATIONS D'ORIGINE
« Péricardite » . . . . .	Péricardite.
1. . . . .	Méningite mortelle.
2. . . . .	Selles.
10 . . . . .	Hémoculture.
11. . . . .	Hémoculture, isolée par Le Minor, étiquetée « B5 W ».
« Rance » . . . . .	Isolée par Buttiaux de la Rance, étiquetée « B5 W ».

Nous avons mesuré dans l'appareil de Warburg réglé à 37° la quantité d'oxygène absorbée par des bactéries non proliférantes pendant l'attaque d'une quantité connue de glucose. Les souches de *Moraxella* étaient cultivées sur un milieu minéral additionné de nitrate et d'alcool (2 p. 100). Les souches de *Neisseria*, qui ne se développaient pas dans un milieu minéral, étaient cultivées sur eau peptonée (2 p. 100) glucosée (2 p. 100). Les microbes étaient lavés une fois par centrifugation à la température du laboratoire.

#### RÉSULTATS.

*Neisseria*. — Les 3 souches de *Neisseria* absorbaient les quantités suivantes d'oxygène pendant l'attaque d'une molécule de glucose.

<i>Neisseria perflava</i> 52180 . . . . .	2 molécules d'oxygène.
<i>Neisseria sicca</i> 52183 . . . . .	3 — —
<i>Neisseria perflava</i> 52184 . . . . .	4 — —

La figure 1 représente les résultats obtenus avec *Neisseria perflava* 52180.

*Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*. — La figure 2 représente les

résultats obtenus avec la souche « péricardite » ; un atome d'oxygène est absorbé pendant l'attaque d'une molécule de glucose. Les 5 autres souches de *Moraxella* fournissent toutes ce même résultat.

Dans les mêmes conditions, *Neisseria winogradskyi* absorbe un atome d'oxygène pendant l'attaque d'une molécule de glucose et il a été démontré que cette absorption correspondait à la transformation du glucose en acide gluconique [1, 12]. Aussi, travaillant avec la souche « péricardite » nous avons recherché et cons-

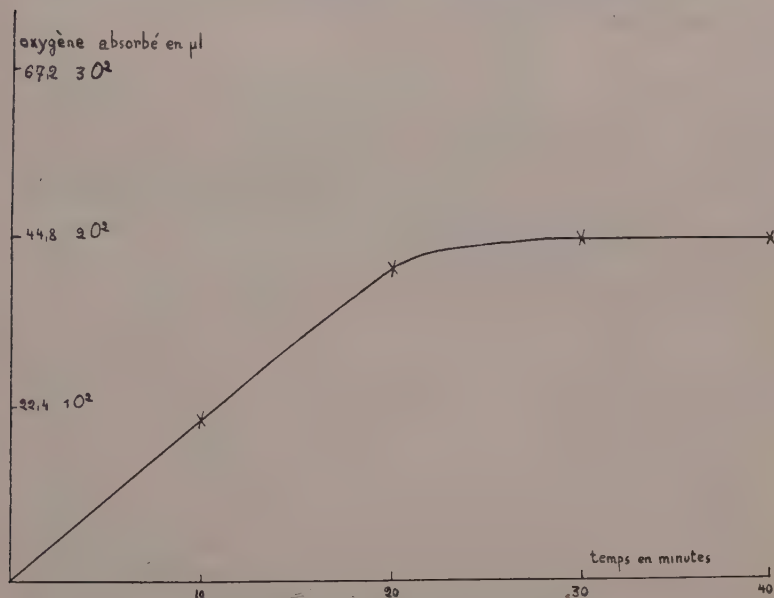


FIG. 1. — *Neisseria perflava* 52180.

La cupule contient 2 ml de liquide renfermant 2,2 mg de microbes, 1 micromole de glucose et du tampon phosphate M/20 pH 6,0 ; la respiration endogène (12 µl en 40 m) a été soustraite.

taté une production massive d'acide gluconique ; la souche est cultivée sur un milieu minéral additionné d'alcool et de nitrate : on recueille 3 g de microbes, qui sont lavés une fois et remis en suspension dans 1 l d'eau distillée contenant 20 g de glucose et 10 g de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ . Pour aérer intensément la suspension, elle est répartie en couches minces dans des fioles d'Erlenmeyer qui sont placées sur un agitateur ; deux heures et demie plus tard, le glucose a déjà entièrement disparu ; la suspension est alors centrifugée et le surnageant reçoit 3 volumes d'alcool ; un abondant précipité se forme, qui est recueilli, redissous dans l'eau chaude et cristallisé dans un mélange alcool-eau. Après recristallisation, nous avons pu identifier ce produit au gluconate de



calcium par trois critères : dosage de calcium, pouvoir rotatoire en l'absence et en présence de molybdate d'ammonium [48], préparation et caractérisation du phénylhydrazide de l'acide gluconique. Sans aucune précaution quantitative, nous avons obtenu 16,5 g de gluconate de calcium brut, soit 65 p. 100 du rendement théorique.

D'autres propriétés concernant l'attaque du glucose, observées

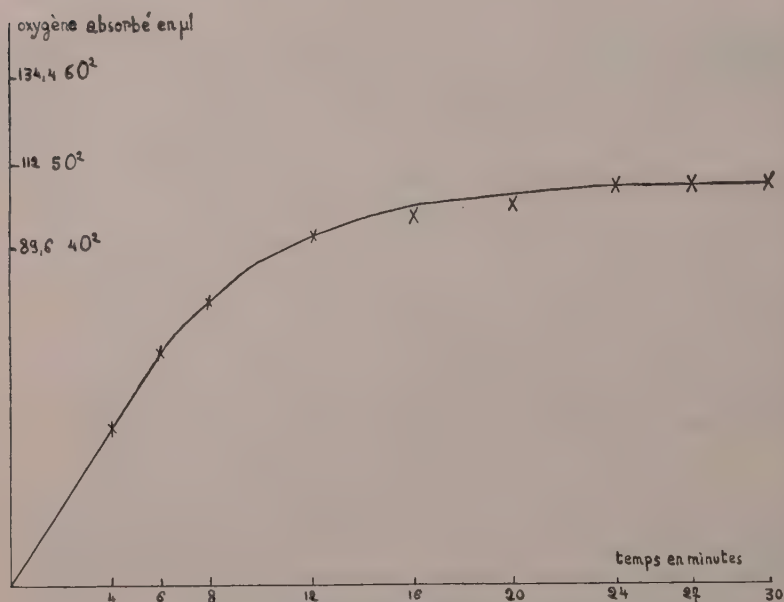


FIG. 2. — *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, souche « péricardite ».

La cupule contient 2 ml de liquide renfermant 1 mg de microbes, 10 micromoles de glucose et du tampon phosphate M/20 pH 6,0 ; la respiration endogène (2 µl en 30 m) a été soustraite.

antérieurement chez *Neisseria winogradskyi* le sont aussi chez les souches de *Moraxella*. Nous avons constaté les trois faits suivants avec les souches de *Moraxella* examinées :

1° L'attaque du glucose est toujours puissante : les chiffres du tableau II, obtenus dans les meilleures conditions, montrent chez les *Moraxella* un  $QO_2$  (quantité d'oxygène absorbé par milligrammes de microbes et par heure) considérable, plusieurs fois supérieur à celui des *Neisseria*.

2° Le glucose est puissamment attaqué par des bactéries qui, conformément au protocole adopté, s'étaient développées en l'absence de glucose.

TABLEAU II. — Valeur du  $QO_2$  en présence du glucose dans les meilleures conditions.

<i>Neisseria winogradskyi</i>	<i>Moraxella lwoffii</i> var. <i>glucidolytica</i>	<i>Neisseria</i>
Souche 69 . . . 370	Souches « péricardite » . . . 770	<i>perflava</i> 52180. 60
	1 . . . . . environ 400	<i>sicca</i> 52183 . . . 80
	2 . . . . . environ 400	<i>perflava</i> 52184. 40
	10. . . . . environ 400	
	11. . . . . environ 500	
	« Rance ». environ 500	

3° Alors que, avec agitation, la croissance est massive en présence d'alcool dans un milieu minéral liquide (au bout de vingt-quatre heures, 3 mg par millilitre, soit 3 000 d'opacité au Meunier dans le jaune avec la souche « péricardite »), elle est pratiquement nulle dans les mêmes conditions modifiées par la substitution de 2 p. 100 de glucose aux 2 p. 100 d'alcool (15 d'opacité au bout de cinq jours avec la souche « péricardite »). Il a déjà été montré que *Neisseria winogradskyi* ne peut utiliser le glucose pour sa croissance en l'absence de certains acides aminés et facteurs de croissance [42].

Le système enzymatique qui, chez *Neisseria winogradskyi*, oxyde le glucose en acide gluconique a été étudié par Aubert, Gavard et Milhaud [4]. Suivant sans modification le protocole adopté par ces auteurs, nous avons obtenu avec la souche « péricardite » des résultats en tous points identiques aux leurs. En partant de 2,4 g de bactéries, cultivées sur milieu minéral additionné de nitrate et d'alcool, récoltées, lavées et mises en suspension dans 100 ml d'eau bidistillée, on obtient après ultrasonation et centrifugation, un extrait brut exempt de cellules qui, en présence de glucose et dans les meilleures conditions, fixe par millilitre 840  $\mu$ l d'oxygène en quinze minutes (les mêmes opérations entreprises sur la souche de *Neisseria winogradskyi* qu'utilisait Aubert et à partir de 3 g de bactéries aboutissent au chiffre de 230  $\mu$ l). La fraction de l'extrait brut qui précipite par  $SO_4Am_2$  entre 0,25 et 0,35 de saturation est isolée et utilisée dans une série d'expériences où le système enzymatique a manifesté les propriétés suivantes : *Spécificité* : le système attaque le glucose et le galactose, mais n'attaque pas le lévulose. *Influence du pH* : le maximum d'activité se situe vers pH 6,0. *Influence du phosphate* : l'activité reste inchangée dans un tampon phosphate 0,05 M et dans un tampon ph'atate en présence de phosphore se trouvant à l'état d'impureté et à une concentration qu'un dosage montre être de l'ordre de  $10^{-4}$ . *Influence de la pression partielle d'oxygène* : l'activité reste inchangée dans une atmosphère d'air et d'oxygène pur. *Inhibiteurs* : les inhibiteurs étant ajoutés à la concentration 0,005 M, l'acide monoiodacétique et FNa ne pro-

voquent pas de nettes inhibitions contrairement à CNK qui inhibe très fortement. *Nature de l'enzyme* : une quantité de système enzymatique capable d'attaquer en présence d'air 15 micromoles de glucose en quinze minutes, mise sous vide dans des tubes de Thunberg en présence d'un excès de glucose, ne provoque pendant le même temps aucune décoloration du bleu de méthylène présent en quantité égale à 0,6 micromole. D'autre part, le système enzymatique étant mis en présence de glucose et de D. P. N., la réduction du D. P. N. n'est pas observée. Par dialyse à 0° pendant quinze heures contre une solution de ClH 0,05 N contenant 7,5 p. 100 de SO<sub>4</sub>Am<sub>2</sub> puis pendant quatre heures contre eau bidistillée, la solution enzymatique perd la quasi totalité de son activité (5 µl en une heure), qu'elle récupère partiellement en présence de Mn<sup>++</sup> à une concentration 0,005 M (61 µl en une heure). De plus, la souche « péricardite » ayant été cultivée en présence d'alcool et en l'absence de glucose, nous retrouvons des bactéries qui se multiplient en synthétisant un puissant enzyme qu'elles n'utilisent pas.

#### DISCUSSION.

Piéchaud [14] avait trouvé *Neisseria winogradskyi* identique aux *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* pour tous les caractères recherchés après étude de la morphologie, des propriétés biochimiques par la technique courante des bactériologistes, de la sérologie et du pouvoir pathogène. Les plus importants de ces caractères communs étaient : la morphologie se présentant avec une allure rappelant les *Neisseria*, mais comportant, dans certaines conditions, la présence de diplobacilles, l'immobilité, la croissance abondante sur les milieux ordinaires, le développement dans un milieu minéral avec de l'alcool et sans facteurs de croissance, l'aérobiose stricte, l'attaque en eau peptonée du glucose et de certains autres glucides, le saccharose et le lévulose n'étant pas attaqués. D'autre part, *Neisseria winogradskyi* est agglutinée par un sérum anti-*Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* [15] et le pouvoir pathogène pour la souris de *Neisseria winogradskyi* est tout à fait comparable à celui des *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* : « Sur 10 souches de *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, 6 étaient pathogènes pour la souris et, parmi elles, une souche de *Neisseria winogradskyi* [15] ; elles tuaient la souris en un jour par voie intrapéritonéale à la dose de 0,5 ml d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures [14]. » Nous avons aussi révélé chez les souches de *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* quelques autres propriétés biochimiques observées de façon constante chez *Neisseria winogradskyi* ; dans le milieu liquide contenant 4 p. 100 de sucre, 0,5 p. 100 de peptone et réparti en petites quantités dans des tubes à essais, où nous avons noté une acidification du maltose

et du lactose par *Neisseria winogradskyi* [4], les 6 souches de Piéchaud étudiées ci-dessus possèdent la même propriété ; Schaub avait déjà insisté sur l'attaque du lactose présent en fortes concentrations par *Bacterium anitratum*. De plus, sur le milieu minéral renfermant du butanediol comme aliment carboné où *Neisseria winogradskyi* se développe massivement [11], 4 souches de Piéchaud produisent des cultures massives (au bout de vingt-quatre heures, 3 mg par millilitre, soit 3 000 d'opacité au Meunier dans le jaune avec la souche « péricardite ») et 2 souches se développent faiblement (50 d'opacité au bout de cinq jours avec la souche 10).

D'après les résultats de notre travail, les 6 souches de *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* comme *Neisseria winogradskyi* ne peuvent utiliser le glucose pour leur croissance, mais cultivées en l'absence de glucose contiennent néanmoins toujours un système enzymatique constitutif capable de l'oxyder très rapidement en fixant un atome d'oxygène par molécule ; cette fixation correspond à la transformation du glucose en acide gluconique sans dégradation ultérieure et le système enzymatique est celui d'Aubert et collaborateurs, de découverte très récente. La production par certaines bactéries d'acide gluconique aux dépens du glucose est bien connue. Des *Pseudomonas fluorescens* sont utilisés pour cette production dans l'industrie et certaines souches donnent des rendements voisins de 100 p. 100. Mais ces résultats sont obtenus dans des conditions spéciales, notamment une concentration très élevée en glucose et sous pression d'oxygène : Blachère [4 bis], opérant sur 12 souches de la collection de *Pseudomonas fluorescens* de notre laboratoire, a toujours observé avec des bactéries non proliférantes une fixation de plusieurs molécules d'oxygène par molécule de glucose ; d'autre part, tous les *Pseudomonas fluorescens* peuvent classiquement se développer aux dépens du glucose, ce qui s'oppose en théorie à l'arrêt de la dégradation du glucose au stade acide gluconique. Après avoir fourni cet exemple, nous disons qu'à notre connaissance, à part peut-être quelques *Acetobacter* et *Pseudomonas*, il n'a jamais été signalé en dehors du groupe *Neisseria winogradskyi*-*Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, de microbes vivants capables dans les conditions ordinaires des bactéries non proliférantes de transformer le glucose en acide gluconique sans dégradation ultérieure. Il est donc permis de rapprocher très étroitement *Neisseria winogradskyi* du groupe B 5 W, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* ; ce rapprochement va probablement jusqu'à l'identification complète, puisque, après étude poussée, il n'a pas pu être observé de différences ; il vaut la peine de souligner qu'une bactérie (*Neisseria winogradskyi*) très répandue dans le sol semble s'identifier à un groupe de germes pathogènes.



★ ★

Nous avons eu l'occasion d'étudier 15 souches de *Neisseria winogradskyi* isolées de terres différentes ; nous avons toujours vérifié l'homogénéité remarquable de ces souches identiques pour tous les caractères recherchés [4], alors que très souvent, lorsqu'on isole du sol plusieurs souches de bactéries qui apparaissent voisines, elles se répartissent en plusieurs types différents. Bien que plusieurs groupes sérologiques soient décrits, les travaux de Schaub, Piéchaud et à un moindre degré ceux de Stuart, Ferguson et Brooke, témoignent aussi de l'homogénéité du groupe B 5 W-*Bacterium anitratum*-*Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*.

★ ★

Nous sommes en présence d'un groupe répandu, homogène, bien défini et limité. A quel genre faut-il le rattacher ? Différentes opinions figurent dans le tableau III.

TABLEAU III. — Différentes opinions sur la position systématique du groupe *Bacterium anitratum*-B 5 W-*Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*-*Neisseria winogradskyi*.

SCHAUB	STUART	P. ECHAUD	BRISOU ET FLOCH
<i>Bacterium anitratum</i> .	B 5 W Entérobactérie probable	<i>Moraxella lwoffii</i> var. <i>glucidolytica</i> .	<i>Achromobacter</i> .

Nos résultats ont montré que les 3 souches de *Neisseria* attaquent le glucose en fixant plusieurs molécules d'oxygène par molécule. Ce caractère s'ajoute à de nombreux autres qui nous obligent à retirer *Neisseria winogradskyi* du genre *Neisseria* où cette bactérie était placée à titre provisoire.

Piéchaud propose *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*. Nous devons insister ici sur la spécificité vraisemblable, l'intensité et la constance de la glycolyse. Les souches de *Neisseria winogradskyi* isolées depuis cinq ans, repiquées régulièrement sur un milieu au butanediol exempt de glucose, possèdent encore le puissant système enzymatique d'Aubert et collaborateurs. Tenant compte également de l'abondance de ces bactéries et de leur homogénéité, nous ne sommes pas partisans d'en faire une simple variété de *Moraxella lwoffii*, espèce dépourvue d'action sur les sucres. Nous considérons ce groupe comme une espèce autonome, qui pourra éventuellement se situer dans le voisinage de *Moraxella lwoffii*. D'autre part, l'entrée dans le genre *Moraxella* des *Moraxella lwoffii* et *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* est actuellement contestée ; Henriksen en 1952 [10], suivi par d'autres



auteurs [5, 9], revient à la définition donnée par Lwoff du genre *Moraxella*, et cette définition comprend l'incapacité de se multiplier dans un milieu minéral sans peptone et l'attaque d'aucun sucre. Henriksen ajoute à cette définition la sensibilité à la pénicilline et une réaction de l'oxydase positive. *Moraxella lwoffii* qui se multiplie dans un milieu minéral, et à plus forte raison *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, s'écartent de la définition de Lwoff. De plus, ces germes sont résistants à la pénicilline et ne donnent pas la réaction de l'oxydase (nous avons retrouvé ces caractères chez *Neisseria winogradskyi*). Henriksen rejette pour ces raisons *Moraxella lwoffii* et *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* du genre *Moraxella*.

Il est difficile de suivre sans réserves Brisou et Floch [6, 9], la définition du genre *Achromobacter* est en effet si vague qu'il est possible d'y faire rentrer beaucoup d'espèces même très éloignées.

En résumé, la question reste posée. Il appartiendra aux spécialistes de se mettre d'accord sur un nom définitif et il sera peut-être nécessaire pour cela de créer un nouveau genre. En attendant, pour raison d'antériorité, nous appellerons *Bacterium anitratum* l'ancien *Neisseria winogradskyi*.

N. B. — *Herellea vaginicola*, décrit par de Bord dès 1942, serait, selon certains auteurs, identique aux bactéries groupées sous le nom de *Bacterium anitratum*. En janvier 1954, nous avons consulté A. Lwoff qui reconnaît cette antériorité et propose le nom de *Moraxella vaginicola*.



Notons les services rendus dans les travaux de classification par des techniques biochimiques ; les bactéries non proliférantes et l'appareil de Warburg ont peut-être l'avenir pour eux en bactériologie courante.

#### RÉSUMÉ.

L'attaque du glucose par 9 souches a été examinée avec la technique des bactéries non proliférantes, dans un appareil de Warburg : 3 souches de *Neisseria* attaquent le glucose en fixant plusieurs molécules d'oxygène pendant l'attaque d'une molécule de glucose. Six souches de *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, mises en présence de glucose, se comportent en tous points comme une bactérie très répandue dans le sol appelée jusqu'ici à titre provisoire *Neisseria winogradskyi* : elles attaquent le glucose avec une rapidité considérable en fixant 1 atome d'oxygène par molécule de glucose ; cette fixation correspond à la transformation quantitative du glucose en acide gluconique sans dégradation

ultérieure, sous l'action d'un système enzymatique constitutif de découverte très récente.

La bactérie du sol est écartée définitivement du genre *Neisseria* : elle rentre parfaitement sans pouvoir jusqu'ici s'en différencier, dans un groupe de bactéries que les médecins ont commencé récemment à décrire sous les synonymes *Bacterium anitratum*, B 5-W, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*. Ce groupe est homogène, très bien défini et limité, mais il ne lui a pas encore été attribué de nom générique admis de tous. Notre travail révèle chez ce groupe une propriété simple, peut-être spécifique, très nette et très constante.

En attendant l'accord des spécialistes sur un nom définitif, nous appellerons pour raison d'antériorité *Bacterium anitratum* l'ancien *Neisseria winogradskyi*.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J.-P. AUBERT, G. MILHAUD et R. GAVARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1165.
- [2] J.-P. AUBERT et R. GAVARD. *Ces Annales*, 1953, **84**, 735.
- [3] A. AUDUREAU. *Ces Annales*, 1940, **64**, 126.
- [4] H. BLACHÈRE, P. VILLECOURT et G. JACOBELLI. *Ces Annales*, 1952, **83**, 391.
- [4 bis] H. ELACHÈRE. *Communication verbale*.
- [5] J. BRISOU et R. MORICHAU-BEAUCHANT. *Ces Annales*, 1952, **82**, 640.
- [6] J. BRISOU. *Ces Annales*, 1953, **84**, 812.
- [7] M. S. BROOKE. *Acta path. microbiol. scand.*, 1951, **28**, 338.
- [8] W. W. FERGUSON et L. F. ROBERTS. *J. Bact.*, 1950, **59**, 171.
- [9] H. FLOCH. *Ces Annales*, 1953, **85**, 675.
- [10] S. D. HENRIKSEN. *J. gen. Microbiol.*, 1952, **6**, 318.
- [11] M. LEMOIGNE, H. GIRARD et G. JACOBELLI. *Ces Annales*, 1952, **82**, 389.
- [12] M. LEMOIGNE et M. CROSON. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1075.
- [13] A. LWOFF. *Ces Annales*, 1939, **62**, 168.
- [14] D. et M. PIÉCHAUD et L. SECON. *Ces Annales*, 1951, **80**, 97.
- [15] D. PIÉCHAUD. *Communication verbale*.
- [16] L. G. SCHAUB et F. D. HAUBER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 379.
- [17] C. A. STUART, S. FORMAL et V. S. MCGANN. *J. inf. Dis.*, 1949, **84**, 235.
- [18] I. VINTILESCO, C. N. IONESCO et N. STANCIU. *J. Pharm. Chim.*, 1938, **28**, 282.

# **SIGNIFICATION ET INTERPRÉTATION DE LA NUMÉRATION SUR PLAQUES DES GERMES TELLURIQUES**

par D. LAVERGNE (\*).

*(Institut Pasteur, Service de Microbie technique.  
Laboratoire de Microbiologie du Sol.)*

Malgré les nombreuses critiques dont elle a été l'objet, la numération sur plaques reste en microbiologie du sol un examen de routine couramment utilisé. Bien que l'on ait fait remarquer qu'il est impossible de dénombrer tous les germes vivants à cause de l'effet sélectif des milieux utilisés, on apprécie toujours son intérêt comparatif en supposant que les colonies apparues se sont formées à partir d'un seul germe.

Malheureusement le facteur personnel est très important et des différences existent entre les techniques et surtout entre les expérimentateurs. La façon d'interpréter les résultats est particulièrement délicate. Voici un exemple qui montrera jusqu'à quel point cette interprétation peut être arbitraire.

Un sol désigné par le chiffre IV donne les résultats suivants :

Dilution $10^{-4}$ . . . . .	12 colonies par boîte en moyenne.
Dilution $10^{-5}$ . . . . .	7,5 colonies.
Dilution $10^{-6}$ . . . . .	3 colonies.

Les boîtes ayant été ensemencées avec II gouttes de chacune des dilutions considérées ci-dessus, on voit par un calcul simple que l'on donnera, suivant que l'on choisit comme base de calcul l'une ou l'autre de ces dilutions, des chiffres qui passent de 1 200 000 pour la première à 7 500 000 et 30 000 000 de germes.

Or rien ne nous autorise à choisir une dilution plutôt qu'une autre comme base de ce calcul, car les index de dispersion des résultats nous montrent que les trois moyennes ont une variabilité sur cinq plaques très comparable.

## **REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES RÉSULTATS DE QUELQUES NUMÉRATIONS.**

Du moment que le nombre des colonies est multiplié ou divisé par trois environ en passant d'une dilution à la suivante tandis

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 décembre 1953.

que la concentration en terre est multipliée ou divisée par dix, en faisant abstraction des erreurs d'expérience possibles, on avait intérêt à représenter graphiquement les résultats obtenus.

Des coordonnées normales ont d'abord été utilisées ; on portait en abscisse le nombre moyen de colonies par série de cinq plaques,

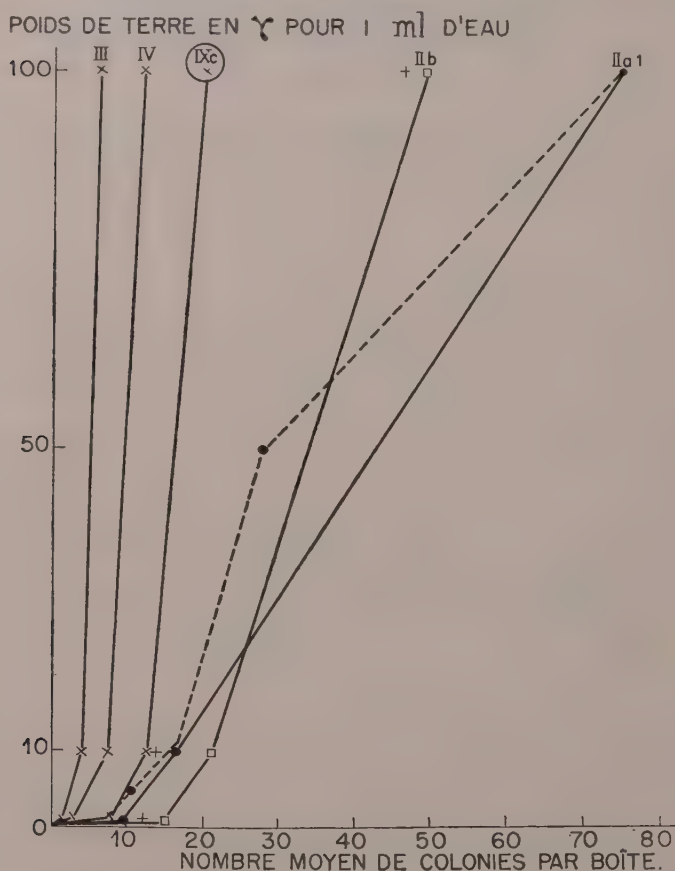


FIG. 1.

et en ordonnée le poids de terre par millilitre de dilution exprimé en microgrammes [sauf pour le sol IX c où l'unité est le millième de microgramme] (fig. 1).

On a comparé quatre terres forestières différentes désignées par les chiffres IX c, IV, III, II b ; les courbes sont construites sur trois points seulement et en traits pleins. Cependant le cas de la terre II b ayant paru intéressant à cause de l'irrégularité des

courbes qu'elle donnait (points indiqués par des croix) suivie de régularisation tardive (points notés par des petits carrés), une courbe en cinq points a été dressée dans ce cas particulier. Elle a été représentée en pointillé ( $II a_1$ ).

On remarque immédiatement que les courbes IX c, III, IV ont la même allure : elles se rapprochent de courbes de type exponentiel. Par contre, la courbe  $II a_1$  est différente. Si on inscrit sur le graphique les nombres moyens de colonies comptés au bout de cinq jours, comme pour les autres terres, on voit (courbe en pointillé) que les chiffres correspondants aux dilutions les plus grandes permettent de tracer une courbe qui, bien qu'elle ne passe pas exactement par ces points mais au milieu d'eux, conserve une

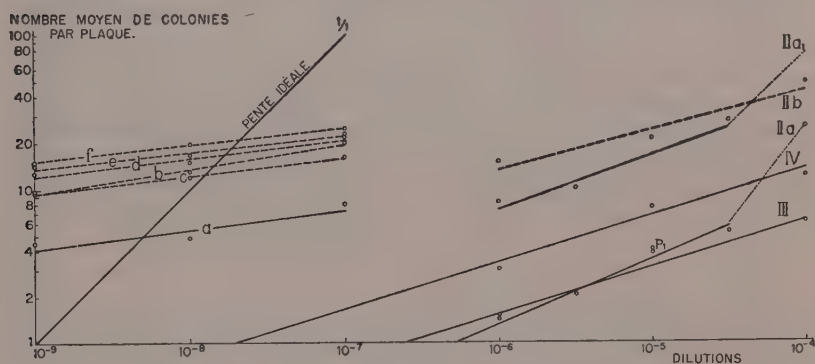


FIG. 2.

forme d'allure exponentielle. Il n'y a rien d'anormal à ce qu'en voulant préciser la forme de la courbe en multipliant le nombre des points de construction, ces points paraissent se disperser légèrement ; c'est une conséquence de la répartition des germes sur les cinq plaques de numération en fonction des lois du hasard. Par contre, à partir de la dilution  $10^{-4,5}$ , la courbe s'infléchit très nettement de façon très significative.

Ce résultat sera discuté plus loin.

En raison de l'allure exponentielle des courbes, en partie ou en totalité (dans les limites des dilutions étudiées), il était justifié de les construire avec des coordonnées semi-logarithmiques. Elles ont été choisies de telle sorte que la distance représentant en ordonnée 10 colonies soit égale à la distance séparant en abscisse une dilution de la suivante. Dans ces conditions, toute expérience dans laquelle le nombre moyen des colonies microbiennes croît de 10 en 10, pour des dilutions décroissant de 10 en 10, serait représentée par une droite dont la pente serait de 1/1 (fig. 2).

Par rapport à cette courbe idéale, les diverses numérations



s'inscrivent sous forme de droites dont la pente est variable suivant les terres. Nous avons choisi de définir cette pente en faisant, pour chaque droite, le rapport abscisse sur ordonnée. Il permet de chiffrer l'effet perturbateur qu'exercent les sols sur le développement des colonies microbiennes sur plaques. On pourrait l'appeler coefficient de rétention. Sa valeur passe de 2,5 pour le sol II *a*, à 3,25 pour III, 3,5 pour IV et 8 pour IX *a*.

#### DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Il faut essayer de faire une discrimination dans les résultats observés. En effet, ou bien, pour chaque dilution, les germes se répartissent sur chacune des 5 boîtes au hasard et une certaine proportion donne des colonies, ou bien il y a concurrence entre les germes susceptibles de former des colonies et on dénombre plus ou moins de colonies qu'on ne pouvait en attendre. Dans ce cas on observe des boîtes d'aspect très différent pour une dilution donnée, et si on calcule l'index de dispersion des résultats on voit qu'il est très élevé. Fisher donne, pour calculer l'index de dispersion, la formule :

$$X^2 = \frac{S(x - \bar{x})^2}{\bar{x}}$$

où  $\bar{x}$  est la moyenne arithmétique du nombre des colonies et  $S(x - \bar{x})^2$  la somme des carrés des écarts de chaque valeur de ce nombre avec la moyenne pour chaque série de cinq plaques dans chaque dilution. A chaque point des diverses courbes correspond ainsi un certain index de dispersion. On peut alors évaluer si le niveau général de variabilité est conforme à une répartition des résultats en fonction du hasard (selon des séries de Poisson), ou s'il dénote l'existence de concurrence entre les germes qui peuvent pousser sur le milieu utilisé. Notons que sous le nom de concurrence nous désignons aussi bien les effets favorables, que les effets défavorables que les germes exercent réciproquement sur la croissance de l'ensemble de la population.

Fisher donne en effet des tables qui permettent de connaître la probabilité de variation de  $X^2$  en fonction du nombre des essais moins un (ici quatre), pour chaque dilution.

Les courbes dont le niveau général de variabilité est conforme à l'hypothèse d'une série de Poisson se reconnaissent à ce que la somme des  $X^2$  reste comprise entre des valeurs connues. Ces courbes ont été marquées en traits pleins sur le graphique semi-logarithmique. Les autres courbes sont en pointillé. Leurs index de dispersion sont très élevés, parce qu'il y a interrétion des germes facilitant ou inhibant le développement des colonies. Le point  $P_1$  est le seul point nettement aberrant. Il correspond à la

courbe III ; une seule des cinq boîtes de Petri contient quinze fois plus de colonies que les autres, ce qui a été interprété comme une contamination.

Il est satisfaisant pour l'esprit de constater que les courbes où les lois du hasard interviennent sont celles où le nombre moyen des germes par plaque est bas (au-dessous de 15 dans les cas étudiés) et où la lecture est faite très précocement (exemple de la terre IX où la première lecture seule donne une courbe en traits pleins).

#### APPLICATIONS PERMISES PAR L'EMPLOI D'UNE REPRÉSENTATION GRAPHIQUE.

1° NOMBRE DE GERMES PAR GRAMME DE TERRE. — Par la représentation graphique des résultats, il n'est pas question de donner un chiffre ayant une valeur absolue. Cependant, on peut en partie éviter l'arbitraire de la numération classique. Pour calculer un chiffre représentant le nombre des germes vivants par gramme qui sont susceptibles de se développer sur un milieu donné, on ne peut évidemment utiliser que les courbes tracées en traits pleins. Ceci impose de faire une lecture très précoce et avec un nombre suffisant de dilutions. Avec les terres utilisées nous avons eu des résultats acceptables en utilisant 5 plaques, mais ce chiffre nous paraît devoir être considéré comme un minimum, de même que le nombre de 3 dilutions par sol. D'autre part, il ne peut être question d'extrapoler vers la partie ascendante de la courbe et nous devons rechercher quelle dilution développera une colonie, par l'intersection de la courbe étudiée avec l'axe des abscisses. On peut calculer ainsi que pour la terre IV que nous avons prise comme exemple au début, on trouve par ce procédé 700 000 000 de germes par gramme. Ce chiffre, beaucoup plus élevé que ceux qui ont été précédemment donnés, se rapproche donc des chiffres obtenus par numération directe sur lame. Cependant, s'il est calculé dans des conditions plus précises que dans la méthode classique, sa valeur reste très relative tant que les numérations ne sont pas faites sur des milieux synthétiques parfaitement définis.

On pourrait tenir compte de l'effet perturbateur caractérisé par le coefficient de rétention en divisant le nombre précédent par le chiffre exprimant ce coefficient.

2° COEFFICIENT DE RÉTENTION. — Il est dans une certaine mesure caractéristique des différents sols. Cependant, comme la pente des courbes est tracée de façon assez approximative, il y aurait peut-être intérêt à considérer que les sols peuvent se placer dans cinq groupes différents, suivant que leur coefficient de rétention est inférieur à 2, compris entre 2 et 4, ou 4 et 6, ou 6 et 8, ou 8 et 10.

Dans ce cas les sols II, III, et IV se placeraient dans le deuxième groupe, et le sol IX dans le quatrième. Il ressort en effet de deux expériences faites sur les sols II et IX que la valeur de la pente peut varier d'une expérience à l'autre, bien que l'on utilise la même terre. Cela vient de ce que l'on n'est jamais certain d'opérer rigoureusement dans les mêmes conditions, en particulier quand on prépare les milieux ou quand on fait les dilutions. Pour la terre II, comme pour la terre IX, l'amplitude de la variation observée dans la valeur du coefficient de rétention était assez élevée, puisque l'on passait de 6 à 8 dans un cas et de 4 à 4,5 dans l'autre. Ces différences de pente des droites sont évaluées pour des lectures au cinquième jour.

La pente peut en effet varier au cours du temps comme le montrent les lectures faites avec la terre IX au bout de trente-six heures, quatre-vingt-quatre heures, cent vingt heures, cent soixante-huit heures, deux cent cinquante heures et cinq cents heures. Ce qui est remarquable dans cet exemple, c'est que toutes les courbes obtenues sont grossièrement parallèles. Ce fait montre que pour un sol donné, l'allure de la courbe exponentielle qui retrace le nombre des colonies apparues en fonction des dilutions est caractéristique. Ceci, bien que le nombre des colonies apparues à la première lecture s'inscrive dans les limites d'une variation due au hasard quand on étudie l'index de dispersion des points. Peut-être est-ce là l'indice que les phénomènes de compétition entre germes sont relativement discrets dans le cas de cette terre. La terre II donne un autre exemple, mais dans lequel on note cette fois une différence de pente assez nette entre la droite représentant la lecture au bout de quarante-huit heures (II a) et les suivantes, dont la pente est parallèle à celle de la droite II a 1 seule représentée.

La courbe II a présente aussi, à partir de la dilution  $10^{-4,5}$ , un infléchissement très net. Il est possible que ce ne soit pas un cas particulier et que toutes les courbes, si l'on étudiait plus de 3 dilutions, présentent un tel infléchissement, mais la courbe est hétérogène en ce qui concerne les index de dispersion et c'est un résultat isolé ; il est donc difficile de conclure.

Pour essayer de connaître ce que représente le coefficient de rétention, nous avons comparé les résultats de numérations réalisées avec des dilutions que nous avons laissées à la glacière toute une nuit, de telle sorte que seule l'argile demeure en suspension. Puis nous avonsensemencé séparément sur 4 plaques II gouttes du culot et II gouttes du surnageant. Le résultat global de cette expérience (unique malheureusement) donne cependant une indication. En effet, alors que dans les 9 ml du surnageant argileux, séparé par siphonnage, II gouttes ensemencées sur plaques donnent des nombres de colonies croissant de 2 en 2 de dilution en dilution, le culot donne, dans les

mêmes conditions, des nombres qui croissent de 4 en 4. Remarquons que dans le culot (1 ml) il y a encore de l'argile.

Enfin, si on pèse sur des filtres identiques l'argile recueillie par filtration du surnageant, on voit que l'on a un poids d'argile de plus en plus grand en passant des terres II et III aux terres IV et surtout IX (deux fois plus d'argile que pour II).

L'indication que donne cette expérience, qui se rattache d'ailleurs à d'autres recherches, valait cependant la peine d'être signalée au passage, car elle montre que le pouvoir « absorbant » de l'argile ou plutôt des complexes argilo-humiques, s'étend aux microorganismes telluriques et surtout que les colonies qui apparaissent sur plaques sont loin de correspondre à un seul germe. L'action de l'argile n'est d'ailleurs certainement pas le seul facteur responsable et il semble que l'on doive plutôt considérer comme important le rapport teneur en argile/nombre de germes par dilution.

3° VALEUR DES MILIEUX UTILISÉS. — Toutes les expériences qui ont donné des résultats satisfaisants ont été réalisées avec le milieu gélosé à l'extrait de terre. Tous les essais pour utiliser des milieux définis et plus riches en substances nutritives ont donné des déboires. En particulier, sur un milieu à l'extrait de levure et extrait de terre, nous avons obtenu une courbe complexe dans laquelle le nombre des colonies est relativement plus bas pour les dilutions moyennes que pour les dilutions extrêmes. C'est peut-être que pour ces dilutions moyennes existe une véritable zone où la concurrence est élevée, tandis qu'ailleurs il y a dès l'ensemencement pas assez de germes ou trop pour que la compétition puisse jouer. L'interprétation étant très aléatoire, il vaut mieux s'en tenir, pour les numérations, à des milieux éprouvés.

C'est ici justement que la régularité graphique des résultats obtenus nous paraît constituer un test intéressant de la valeur d'un milieu.

#### CONCLUSION.

Si le résultat de nos expériences paraît encore peu solide en raison notamment du petit nombre de sols étudiés et du petit nombre de numérations effectuées, par contre la méthode de représentation graphique nous semble devoir être féconde en ce qui concerne les numérations de germes telluriques. Elle représente un moyen extrêmement commode de représenter tous les résultats des expériences réalisées en les groupant pour les comparer. Le véritable intérêt de la numération sur plaques des germes telluriques étant l'étude des modalités de la croissance

comparée de ces germes sur un milieu donné, il nous semble que l'allure et les modalités de cette croissance peuvent ainsi être analysées avec plus de fruit.

## BIBLIOGRAPHIE

- J. POCHON et Y. TCHAN. *Précis de Microbiologie du Sol*. Masson, Paris, 1948.
- R. A. FISHER. *Les méthodes scientifiques adaptées à la recherche scientifique*. Traduction Bertrand. Presses Universitaires de France, 1947.
- P. C. T. JONES et J. E. MOLLISON. *J. Microbiol.*, 1943, **41**, 54.



# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.)*

**Séance du 4 février 1954.**

Présidence de M. PRÉVOT.

---

## COMMUNICATIONS

### **ÉVOLUTION DES ANTICORPS DÉVIANT LE COMPLÉMENT POUR LE VIRUS POLIOMYÉLITIQUE TYPE 2 (LANSING) CHEZ LES AFRICAINS DE BRAZZAVILLE**

par A. PELLISSIER, G. AUDEBAUD et P. BASCOULERGUE.

*(Institut Pasteur et Hôpital de Brazzaville.)*

On n'a pas, jusqu'à présent, constaté de poliomyélite-maladie dans la population africaine de Brazzaville. Rappelons que c'est un virus encéphalomyélitique que l'un de nous, avec Trinquier [1], a isolé au cours de l'épidémie de « poliomyélite clinique » de 1951. Il nous a paru intéressant de rechercher les anticorps neutralisant le virus poliomyélitique type 2. Nous avons, pour ces épreuves, utilisé les souches Lansing et MEF1, et nous avons trouvé 40 sérums positifs sur 81 sérums d'adultes examinés, soit 49,3 p. 100.

Ces résultats sont analogues à ceux obtenus en d'autres régions tropicales où également la poliomyélite-maladie est rare ou inexistante, mais où, par contre, la poliomyélite-infection est fréquente.

Par la réaction de déviation du complément, en utilisant un antigène préparé avec le cerveau de souris, telle que l'un de nous l'a décrite et employée [2], nous avons obtenu 130 sérums positifs sur 430 sérums d'adultes examinés, soit 30,2 p. 100. Le chiffre donné par la déviation du complément est donc inférieur à celui de la séro-neutralisation, mais nous avons pensé que, toutes choses étant égales par ailleurs, nous pourrions étudier par cette dernière réaction l'évolution des anticorps en fonction de l'âge et du sexe.

Nous avons ainsi examiné 594 sérums et obtenu les résultats suivants :

ÂGES	SEXE MASCULIN		SEXE FÉMININ		TOTAL		
	Examinés	Positifs	Examinés	Positifs	Examinés	Positifs	p. 100
1 à 2 ans . . .	55	16	60	17	115	33	28,6
5 ans . . . . .	58	10	56	9	114	19	16,6
10 ans . . . . .	53	9	62	17	115	26	22,6
15 ans . . . . .	65	19	63	19	128	38	29,7
20 ans . . . . .	55	18	67	19	122	37	30,3

La représentation graphique est donc la suivante (fig. 1).

Les résultats d'ensemble sont donc analogues à ceux publiés pour la première fois par Turner et coll. [3] par l'utilisation du test de

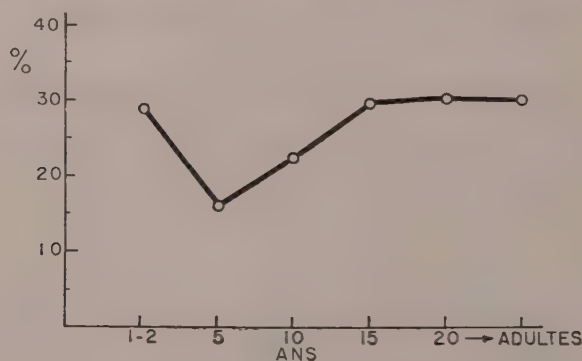


FIG. 1.

séro-neutralisation. On doit cependant noter un certain décalage de la courbe vers la droite et un étalement de la période de contamination. Il semble que ce soit entre 5 et 15 ans que se produise la poliomyélite-infection.

**DISCUSSION.** — Nous avons tenu à rapporter ces résultats, comme contribution à l'étude des anticorps poliomyélitiques, quoi qu'ils soient en contradiction avec ceux de certains auteurs.

Il faut reconnaître en effet que la question de l'apparition d'anticorps du type 2 dans une population indemne de poliomyélite-maladie ou dans laquelle sévit seulement la poliomyélite du type 1, est assez confuse et que bien des résultats contradictoires ont été publiés, aussi

bien après les tests de séro-neutralisation qu'après les réactions de déviation du complément.

La classification et la séparation immunologique du virus poliomyélitique en trois types (1, Brunhilde ; 2, Lansing et 3, Leon) qui n'ont pas entre eux d'antigène commun, a fait penser que les anticorps mis en évidence pour le type 2 n'étaient pas spécifiques. Cependant l'apparition de ces anticorps a pu être suivie après une épidémie du type 1 et, à la suite de nombreux travaux [4, 5, 6, 8, 9] utilisant les tests de séro-neutralisation, il est actuellement admis que le taux des anticorps pour le type 2, dans une population donnée, est la signature d'une immunité de cette population vis-à-vis de l'infection poliomyélitique. La première courbe établie par Turner et coll. a été confirmée un peu dans tous les pays et les chiffres obtenus sont, chez l'adulte, de l'ordre de 85 à 95 p. 100 de sérums positifs. On a cependant également noté que ces anticorps étaient trouvés dans une proportion beaucoup plus grande chez les enfants normaux que chez ceux qui avaient fait une poliomyélite. C'est ainsi que Brown et Francis [10] ont trouvé 35 p. 100 de sérums neutralisants chez les anciens malades, contre 73 p. 100 chez les témoins. Ceci expliquerait sans doute les résultats apparemment paradoxaux publiés récemment par Sabin [11]. Cet auteur présente comme transitoires (ne dépassant pas une durée de trois mois) les anticorps neutralisant le type 2 apparus chez des malades infectés par le type 1.

Avec la réaction de déviation du complément, les résultats publiés sont encore plus contradictoires. Casals, Olitsky et Sabin [12] ont étudié 81 cas de poliomyélite dont ils ont examiné les sérums après sept jours et après trois mois de maladie. Après sept jours, 87 p. 100 des sérums étaient positifs ; après trois mois il y en avait seulement 76 p. 100. Les auteurs ont ensuite récolté 159 sérums, prélevés dans la population non malade, dans le courant des douze mois qui ont suivi l'épidémie. Ces sérums ont donné 42 p. 100 de résultats positifs. Il semblerait donc que les anticorps déviant le complément se comportent de façon inverse par rapport aux anticorps neutralisants : étant beaucoup plus importants à la suite de la poliomyélite-maladie que de la poliomyélite-infection.

Ces résultats ne sont cependant pas confirmés par Pollard [13], qui a suivi sérologiquement 85 cas de poliomyélite. Au quinzième jour cet auteur ne trouve que 11 sérums positifs et au bout de trois mois tous les sérums étaient négatifs. Et Pollard de conclure que la déviation du complément est un test d'infection récente, et encore un mauvais test. Nous pensons que la pauvreté des résultats obtenus par cet auteur tient à l'antigène qu'il a utilisé et qui était à base de liquide céphalo-rachidien de sigmodon, au lieu d'être l'antigène du type Casals au cerveau de souris.

Enfin nous devons nous arrêter davantage sur l'importante étude de Goldblum et Melnick [14] effectuée sur la population du Caire. Ces auteurs ont comparé les résultats obtenus par la séro-neutralisation et par la réaction de déviation du complément. La courbe de séro-neutralisation est du type de la courbe habituelle. Les sérums positifs sont de : 80 p. 100 à la naissance, 10 p. 100 à l'âge de 6 mois, 60 p. 100 à 1 an, 80 p. 100 à 2 ans et 95 p. 100 à partir de 10 ans et chez les

adultes. Parallèlement la courbe des sérums positifs à la réaction de déviation du complément est de : 5 p. 100 à 6 mois, 45 p. 100 à 1 an, 50 p. 100 à 3-4 ans, 45 p. 100 à 5-9 ans, 15 p. 100 de 10 à 20 ans, puis décroît peu à peu pour atteindre le zéro après 30 ans. Ces résultats montrent, d'une part que dans une population donnée le nombre des sérums déviant le complément pour le virus poliomyélitique type 2 est environ moitié moins important que celui des sérums neutralisant le même virus. Ils montrent d'autre part que les anticorps déviant le complément existent pendant un certain nombre d'années et sont loin de disparaître après trois mois.

Les résultats que nous avons obtenus sont donc en grande partie concordants avec ceux de Casals et coll. pour les sérums de la population normale et avec ceux de Goldblum et Melnick sur la population du Caire. La seule différence avec ces derniers réside dans le fait que nous avons constaté une persistance des résultats positifs chez l'adulte.

CONCLUSIONS. — Tout en reconnaissant que des contradictions apparaissent encore et que les recherches doivent être poursuivies, il nous semble que les conclusions suivantes peuvent être tirées des constatations faites par les différents auteurs et par nous mêmes.

Les anticorps déviant le complément ont un comportement inverse de celui des anticorps neutralisants. Tandis que ces derniers sont surtout importants pour les sujets faisant la poliomyélite-infection et restent minimes chez les sujets faisant la poliomyélite-maladie, les anticorps déviant le complément se manifestent intensément chez les malades paralytiques et n'apparaissent qu'en moins grande quantité dans la population normale.

Compte tenu de ce chiffre inférieur par rapport à celui donné par la séro-neutralisation, la réaction de déviation du complément pratiquée sur une population donnée peut permettre d'établir la courbe de l'évolution des anticorps pour le virus poliomyélitique type 2. Nous avons par cette technique obtenu une courbe analogue à celle donnée par la séro-neutralisation.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. PELLISSIER et E. TRINQUIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 316.
- [2] A. PELLISSIER. *Ces Annales*, 1954, **80**, 53.
- [3] T. B. TURNER, L. E. YOUNG et Y. MAXWELL. *Am. J. Hyg.*, 1945, **42**, 119.
- [4] J. R. PAUL, J. L. MELNICK, V. H. BARNETT et N. GOLDBLUM. *Am. J. Hyg.*, 1952, **55**, 902.
- [5] V. PAVILANIS et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 145.
- [6] J. R. PAUL, J. L. MELNICK et J. T. RIORDAN. *Am. J. Hyg.*, 1952, **56**, 232.
- [7] V. PAVILANIS et A. FRAPPIER. *Ces Annales*, 1951, **81**, 583.
- [8] V. PAVILANIS et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1952, **83**, 1.
- [9] V. PAVILANIS et A. FRAPPIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 690.
- [10] G. C. BROWN et Th. FRANCIS. *J. Immunol.*, 1947, **57**, 1.
- [11] A. B. SABIN. *J. exp. Med.*, 1952, **96**, 99.
- [12] J. CASALS, P. K. OLITSKY et A. B. SABIN. *J. exp. Med.*, 1952, **96**, 35.
- [13] M. POLLARD. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **79**, 514.
- [14] N. GOLDBLUM et J. L. MELNICK. *J. exp. Med.*, 1952, **96**, 175.

## REMARQUABLE AFFINITÉ POUR L'ÉPIPLOON D'UNE SOUCHE DE *BRUCELLA ABORTUS*

par H. JACOTOT et A. VALLÉE.

(Aide-Technique : A. LE PRIOL.)

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale.*)

La brucelle dont il sera question dans cette note a été isolée du lait d'une vache appartenant à une ferme de Seine-et-Oise.

*Circonstances de l'isolement.* — En septembre 1952 nous effectuions la prospection sérologique d'un groupe d'une quinzaine de vaches entretenues dans la région de Versailles. Le « ring test », la lacto-agglutination sur lame et la séro-agglutination lente établirent d'une manière concordante que cinq d'entre elles étaient atteintes de brucellose. Le 12 septembre, leurs laits qui avaient été conservés pendant trois jours à la glacière furent inoculés à des cobayes. Trois de ces laits infectèrent les cobayes ; c'est le lait que nous désignerons par la lettre « J » qui a retenu notre attention.

Trois cobayes en avaient reçu 2 cm<sup>3</sup> chacun, l'un par voie hypodermique, l'autre par voie musculaire, le troisième par voie péritonéale. Chez les deux premiers, morts après six semaines et quatre semaines respectivement, on relevait de nombreux abcès de la rate, du foie, des ganglions. Le troisième qui fut sacrifié trois mois après l'inoculation ne présentait comme lésion remarquable qu'une épiploïte purulente massive. Il est à noter que le sérum de ce cobaye a toujours donné une réaction d'agglutination négative, les 26 septembre, 10 et 24 octobre, 7 et 21 novembre ; le premier des deux autres a donné une réaction positive les 10 et 24 octobre. On notera aussi que la brucelle ne put être mise en évidence que chez les deux premiers cobayes ; le germe était présent dans la rate, le foie, les ganglions, les abcès du second ; c'est à lui que fut empruntée la souche étudiée ici (souche « J »).

*Caractères de la brucelle en cause.* — Les caractères huddelsoniens du germe sont ceux de *Br. abortus*, mais son activité uréasique est faible.

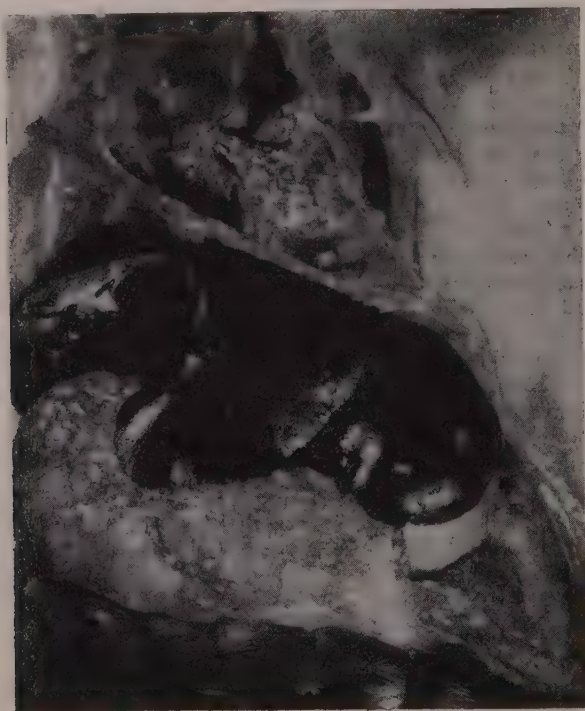
Son comportement chez les petits animaux classe cette brucelle parmi les souches de pouvoir pathogène caractérisé et d'agressivité marquée. Inoculée à 34 rats blancs, par voie péritonéale à la dose de 1 cm<sup>3</sup> de culture avec addition d'une égale quantité de mucine, elle en tue 22 dans les huit jours et 2 autres dans de plus longs délais. Inoculée à des cobayes par voie musculaire ou hypodermique, elle en tue 6 sur 8 dans des délais compris entre trois et dix semaines.

Par voie péritonéale et administrée sous certaines formes (lait, pus, pulpes splénique ou ganglionnaire) avec ou sans addition de mucine, elle tue 28 cobayes sur 33, à la dose moyenne de 1 cm<sup>3</sup> dans des délais de deux à six semaines et 15 lapins sur 23, à des doses comprises entre



2, 5 et 10 cm<sup>3</sup> dans des délais de trois à six semaines le plus souvent.

*Aptitude générale du germe à la pyogénèse et son affinité pour l'épiploon.* — Cette souche présente une aptitude marquée à la pyogénèse lorsqu'on fait usage d'un matériel organique tel que ceux énoncés plus haut, et le processus se développe avec une rapidité remarquable lorsqu'on injecte dans le péritoine. Des abcès peuvent se former dans les parenchymes, dans les ganglions, entre les feuillets du



Brucellose expérimentale du lapin. Epiploïte purulente massive.  
La lésion incurvée repose sur l'estomac, entre le foie et l'intestin.

médiastin, sous la plèvre pariétale, mais ce qui frappe le plus c'est, chez certains sujets, leur localisation au péritoine ; la séreuse est alors frappée d'une sorte de granulie brucellique qui l'intéresse dans toute son étendue, dans ses moindres replis.

C'est alors qu'apparaît une lésion épiploïque inhabituelle. Lorsqu'elle est constituée elle se présente chez l'animal autopsié sur le dos comme une masse jaune d'ivoire, allongée entre le foie et l'estomac qu'elle déborde à gauche ; elle est plus épaisse du côté de la rate et, sur la coupe, de forme ronde ou ovoïde ; son contenu est constitué par un pus de consistance presque toujours épaisse, caséux puis plus ou moins

desséché et friable ; à sa surface se discernent de petits abcès de la séreuse. La plus importante de ces formations que nous ayons observée chez le lapin pesait 56 g (photographie ci-jointe). Nous pensions d'abord que la lésion était centrée sur le pancréas ; en réalité elle prend naissance dans l'épaisseur du bord libre de l'épiploon. Ultérieurement, lorsque la masse purulente gagne vers l'insertion du repli séreux, le pancréas participe au processus ; une pancréatite brucellique s'installe, caractérisée par la formation de nodules à centres nécrosés ; finalement la glande ou ce qu'il en reste se sclérose partiellement ou en totalité (1).

*Facteurs conditionnant la localisation épiploïque.* — Nous n'avons pas pu provoquer cette localisation en injectant le matériel brucellique, quel que fût son substrat, par voie hypodermique ou intramusculaire, mais seulement par voie péritonéale. Nous n'avons pas pu la provoquer non plus en injectant dans le péritoine la culture du germe, même additionnée de mucine.

En revanche nous avons réussi dans la plupart des cas (15 sur 23 chez le lapin et 28 sur 33 chez le cobaye) en introduisant dans la cavité péritonéale les germes avec leur support organique ou, plus précisément, certains produits pathologiques : lait, pus, substances splénique ou ganglionnaire. Ce matériel provenait dans tous les cas de cobayes brucelliques à l'exception du pus qui a été emprunté à des lésions épiploïques ou de lapin ou de cobaye.

L'addition de mucine, bien que ne conditionnant pas l'apparition du phénomène, a semblé favoriser son évolution en même temps qu'elle rendait plus difficile, en général, la détection de la brucelle dans les parenchymes et dans la substance des abcès épiploïques ou autres.

La lésion épiploïque paraît se constituer rapidement, au cours du troisième septennaire ; nous avons observé des masses épiploïques considérables chez un lapin qui avait reçu dix-sept jours avant, une suspension de pus, et chez un cobaye qui avait reçu dix-huit jours avant, une suspension de pulpe splénique additionnée de mucine. Cette lésion peut persister pendant plusieurs semaines ; nous en avons observé une d'une certaine importance chez un cobaye sacrifié trois mois après avoir reçu une injection de lait brucellique ; enfin un lapin mort cinq mois après avoir reçu une suspension de pus additionné de mucine présentait encore à ce moment quelques abcès de l'épiploon.

*Considérations sur la genèse de cette affinité.* — Les renseignements que nous avons pu recueillir sur la vache qui a fourni cette brucelle établissent d'une manière à peu près certaine que l'animal s'est contaminé dans l'exploitation même, plusieurs mois après y avoir été introduit. Nous nous sommes proposé de rechercher si les brucelles hébergées par d'autres vaches de ce troupeau possédaient la même affinité. Des laits de deux de ces vaches, nous avons isolé le germe, mais nous n'avons pu reproduire la lésion épiploïque, ni en faisant usage des laits eux-mêmes ni en inoculant des suspensions spléniques après passage sur cobaye.

(1) Nous adressons nos vifs remerciements à nos collègues les D<sup>rs</sup> Dezest et J. Levaditi qui ont bien voulu nous prêter leur concours pour la lecture des préparations histologiques.

Enfin nous avons pareillement échoué en partant de brucelles à pouvoir pathogène caractérisé isolées de fœtus provenant d'autres élevages.

CONCLUSION. — Nous avons isolé du lait d'une vache atteinte de maladie de Bang, une brucelle particulièrement agressive pour le lapin et le cobaye, qui possède la propriété de provoquer chez ces animaux une épiploïte purulente massive lorsqu'on leur injecte par voie péritonéale certains produits pathologiques contenant le germe (lait, suspension de pus, de substances splénique ou ganglionnaire).

Il semble qu'il s'agisse là d'une propriété acquise dans l'organisme de la vache en question, car elle ne se retrouve pas chez les brucelles issues d'autres animaux de la même étable.

### **MODIFICATIONS DU POUVOIR DÉCHAINANT D'UN EXTRAIT DE TISSU, CHEZ DES ANIMAUX SENSIBILISÉS A CET EXTRAIT. SOUS L'INFLUENCE DU SALICYLATE DE SODIUM**

par A. DELAUNAY et G. DUGE DE BERNONVILLE.

*(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)*

L'un de nous a montré, par un travail déjà publié [1], que du sérum de cheval traité dans des conditions convenables par le salicylate de sodium perdait son pouvoir déchainant chez des animaux sensibilisés au sérum normal. Il nous a paru intéressant de refaire des expériences de même ordre en utilisant un autre antigène, en l'espèce un extrait de tissu. Le tissu que nous avons choisi, pour diverses raisons, a été le rein de rat; l'animal sur lequel nous avons fait nos expériences a été le cobaye.

L'extrait tissulaire mis en œuvre pour sensibiliser les animaux avait été préparé de la façon suivante. Des rats de 120 g sont sacrifiés par section des carotides et immédiatement autopsiés. Les reins sont retirés de leur loge, débarrassés de leur capsule conjonctive et du manchon adipeux qui protège le hile, enfin broyés en présence de sable dans de l'eau physiologique (proportion : 4 reins [4 g] dans 8 ml d'eau salée à 8 p. 1 000). La préparation est centrifugée à grande vitesse pendant quinze minutes; le liquide surnageant est filtré sur papier buvard. Le liquide recueilli est notre extrait. Les cobayes ont été sensibilisés par une injection sous-cutanée de cet extrait (1 ml). Laissés au repos pendant trois semaines (délai nécessaire pour que les anticorps sensibilisants puissent se former), ils étaient alors repris et soumis à une injection intraveineuse d'un extrait de rein de rat.

Dans une première série d'expériences, nous nous sommes servis, pour cette injection intraveineuse (dans la saphène) de deux types d'extraits. Le premier avait été obtenu exactement de la manière

décrite plus haut. Le second était différent en ce sens que l'eau physiologique avait été remplacée par une solution de salicylate de sodium à 10 p. 100. Ces deux préparations ont été utilisées, soit aussitôt après leur préparation, soit après avoir séjourné quelques jours sur une table au laboratoire. Si longue que soit cette conservation (elle fut, dans notre cas, au maximum de neuf jours), les extraits salicylés, naturellement assez visqueux, gluants, restent parfaitement stables ; au contraire, peut survenir, plus ou moins tôt, une précipitation dans les extraits simplement aqueux. Les contaminations accidentelles par microbes ont été exceptionnelles.

Sur 49 cobayes sensibilisés à un extrait de rein de rat normal et mis en expérience trois semaines plus tard, 23 ont reçu, par voie veineuse, 1 cm<sup>3</sup> d'un extrait aqueux de rein, 26, 1 cm<sup>3</sup> d'un extrait salicylé.

RÉSULTATS. — *Cobayes traités par l'extrait aqueux.* — Douze chocs anaphylactiques mortels, 10 chocs typiques mais non mortels, un animal seulement n'a montré aucune réaction.

*Cobayes traités par l'extrait salicylé.* — Sept chocs anaphylactiques mortels, 7 chocs typiques mais non mortels, 7 petits chocs, aucune réaction chez 5 animaux. Le nombre et la gravité des chocs observés chez les animaux traités par l'extrait aqueux ont été sans rapport avec la durée de conservation de cet extrait (que sa préparation ait été faite extemporanément ou neuf jours plus tôt). Au contraire, en ce qui concerne les extraits salicylés, les préparations douées du pouvoir déchaînant le plus marqué ont été celles qui avaient été préparées extemporanément ; en d'autres termes, l'atténuation du pouvoir déchaînant paraît être proportionnelle à la durée du contact entre l'extrait et le salicylate. Pareil fait indique déjà que l'on se trouve en présence d'une modification de l'extrait sous l'influence du corps chimique et non d'une action protectrice directe exercée, soit par le salicylate, soit seulement par la haute teneur en sel du milieu. Pour préciser ce dernier point, nous avons fait d'ailleurs une épreuve de contrôle avec des extraits préparés dans une solution de chlorure de sodium à 10 p. 100, utilisés extemporanément ou après conservation à la température du laboratoire, de neuf jours. *Résultats* : sur 7 cobayes sensibilisés à l'extrait normal de rein de rat et éprouvés avec la préparation que nous venons de définir, nous avons eu 2 chocs mortels, 4 chocs non mortels mais typiques, un petit choc. Pareil pourcentage est manifestement très proche de celui obtenu avec un extrait tissulaire normal.

Ces premiers résultats nous ayant appris que le salicylate — à froid — s'il ne le supprime pas, diminue pourtant dans une notable proportion le pouvoir déchaînant d'un extrait de tissu, nous avons cherché, au cours d'une seconde série d'expériences à augmenter l'action du sel par un chauffage modéré. Un extrait de rein en eau physiologique et un extrait en eau salicylée (10 p. 100), mis au bain-marie, ont été chauffés pendant une heure à 56°. Il y eut précipitation dans les deux préparations mais, par agitation, toutes deux retrouvèrent un aspect homogène. Injectées à des animaux sensibilisés à l'extrait normal, soit aussitôt après le chauffage, soit après quelques jours de maintien à



la température du laboratoire, nous avons recueilli avec elles les résultats que voici :

1° Injection de l'extrait normal chauffé dans la veine de 20 cobayes : 7 chocs anaphylactiques mortels, 8 chocs non mortels mais typiques, 5 petits chocs ;

2° Injection de l'extrait salicylé chauffé chez 21 cobayes : 1 choc mortel, 3 petits chocs ; 16 animaux n'ont fait aucune réaction (mis à part le bref moment d'agitation qui suit toujours l'injection intra-veineuse d'une dose relativement forte de salicylate).

Ajoutons à ces données les suivantes : sur 4 animaux sensibilisés normalement, éprouvés par un extrait de rein préparé dans une solution de chlorure de sodium à 10 p. 100 puis chauffé une heure à 56°, 3 ont fait un choc typique et le dernier un petit choc. Sur 3 animaux éprouvés par un extrait préparé dans une solution de benzoate de sodium également à 10 p. 100 et chauffé une heure à 56°, nous avons eu seulement un petit choc. Un extrait en eau physiologique préparé avec des reins de rat conservés pendant sept mois à —15° a-t-il, chez des cobayes sensibilisés, un pouvoir déchainant diminué par rapport à celui des extraits obtenus en partant de reins fraîchement prélevés ? Il ne le semble pas puisque nous avons obtenu sur 10 animaux traités par le premier : 8 chocs mortels et 2 chocs typiques.

Nous reviendrons plus tard sur l'intérêt de cette dernière observation. Remarquons simplement ici qu'un extrait de rein de rat traité dans des conditions convenables par le salicylate de sodium perd, en tout ou partie, son pouvoir déchainant chez des animaux sensibilisés à l'extrait normal. Cette conclusion, on le voit, recoupe parfaitement celle qui a été précédemment formulée [4].

#### BIBLIOGRAPHIE

[4] A. DELAUNAY. *C. R. Ac. Sci.*, 1953, 237, 947.

## INHIBITION DE LA DIAPÉDÈSE LEUCOCYTAIRE ET LÉSIONS VISCÉRALES OBSERVÉES CHEZ DES ANIMAUX SOUMIS À UNE HYPOTHERMIE EXPÉRIMENTALE

par A. DELAUNAY et J. LEBRUN.

(*Institut Pasteur de Garches et C. N. R. S.*)

Toutes nos expériences ont été faites sur des rats de 200 g environ et, pour refroidir ceux-ci, nous avons eu recours uniquement à la méthode de J. Giaja [4]. Décrivons en quelques lignes cette méthode, qui est encore peu connue. Chaque rat est placé dans un bocal hermétiquement clos de 3 l environ et déposé dans des chambres froides,



trente minutes à  $-15^{\circ}\text{C}$ , puis une heure à  $-5^{\circ}\text{C}$ . Les rats, désormais en état de léthargie, sont à ce moment retirés des bocal ; leur température rectale oscille autour de  $+15^{\circ}\text{C}$ . Cette température restera à peu près stable si l'on prend la précaution de maintenir les animaux dans un local dont la température est, elle aussi, de  $+15^{\circ}\text{C}$  environ. Combien de temps ? Aisément plusieurs heures, une journée semble-t-il au maximum. Alors l'animal meurt si on ne le réchauffe pas. Pareille technique paraît simple à mettre au point. Assez souvent, néanmoins, on observe des accidents (morts précoces), ces derniers étant surtout nombreux au début de l'expérience, lorsque le rat souffre de la privation d'oxygène.

Il est évidemment inutile de mentionner qu'une « hibernation » de cette nature provoque dans l'organisme de très importantes perturbations [2]. La circulation sanguine, notamment, est, on le sait déjà, fort modifiée [3]. Un point, cependant, avait jusqu'à présent été laissé dans l'ombre : comment peut se dérouler, chez des animaux ainsi refroidis, ce phénomène si curieux qu'est la diapédèse leucocytaire ? Compte tenu de nos recherches antérieures en ce domaine [4], nous avons pensé qu'il serait intéressant, voire même utile, de le préciser.

Des rats dont la peau abdominale a été rasée au préalable sont mis, en atmosphère confinée à une température ambiante de  $-15^{\circ}$  puis  $-5^{\circ}$ . Dès que leur température rectale se trouve abaissée aux environs de  $+15^{\circ}\text{C}$ , les animaux, retirés du bocal où ils avaient été primitivement placés, reçoivent par voie sous-cutanée, une ou deux injections (0,5 ml) d'une suspension en eau physiologique de microbes tués (quelques animaux ont reçu aussi une injection intrapéritonéale). Pour ces expériences, nous nous sommes servis de deux souches microbiennes : un staphylocoque et un bacille pyocyanique. Les injections faites, les rats, qui restent en état de léthargie, sont conservés dans une pièce dont la température est de  $+15^{\circ}$  pendant un temps variable : de trois à sept heures (leur température rectale, qui doit se maintenir à  $+15^{\circ}$ , étant vérifiée par de nombreux examens).

Normalement, une injection sous-cutanée (ou intrapéritonéale) de microbes chez le rat entraîne au bout d'une heure la mise en place d'une diapédèse. L'émigration des globules blancs se poursuit, en s'accroissant. Au bout de sept heures, lorsque la marche du phénomène a été régulière, on peut dire qu'aux points d'injections se trouvent amassés d'innombrables polynucléaires. En est-il de même chez les animaux refroidis ? De trois à sept heures après la mise en route des expériences, nous avons sacrifié nos animaux, prélevé les lambeaux de peau où les germes avaient été introduits, traité ceux-ci par les techniques histologiques classiques. Finalement, examens microscopiques des coupes. Ils nous ont montré à la fois la présence des microbes injectés et l'absence totale ou quasi totale, dans la trame conjonctive, de polynucléaires. Mêmes résultats après ponction du péritoine : là encore, pas ou peu de cellules. Une hypothermie expérimentale, du moins dans les conditions que nous avons réalisées, est donc capable de provoquer une inhibition de la diapédèse.

Par quel mécanisme ? Parce qu'il y a leucopénie dans le sang circulant [2] ? C'est peu probable, une leucopénie ne pouvant que diminuer, sans jamais la supprimer, la diapédèse. Une autre explication

paraît meilleure : s'il n'y a pas eu ici migration leucocytaire, c'est parce que, dans l'organisme refroidi, ont pris place des troubles vasculaires graves [3].

Déjà, au cours de nos recherches sur l'inhibition de la diapédèse qui s'installe chez des animaux (cobayes, rats, souris...) intoxiqués par une endotoxine bactérienne, nous avons eu l'occasion de démontrer la part que prennent également dans ce cas, pour la production du phénomène, les modifications profondes subies par l'hydraulique circulatoire [4]. A notre avis, ce sont des processus du même ordre, encore que plus marqués, qui se produisent chez les animaux homéothermes dont la température rectale a été volontairement abaissée à  $+15^{\circ}$  seulement. Mais, chez les animaux intoxiqués par une endotoxine, on trouve non seulement une inhibition de la diapédèse, mais aussi, de six à vingt-quatre heures après l'injection du poison, des lésions lymphocytaires et testiculaires importantes [5]. Or, nous avons affirmé que ces lésions étaient surtout la conséquence des troubles vasculaires concomitants. On devrait donc les retrouver chez les animaux anesthésiés par refroidissement. Une seconde série d'expériences nous a effectivement montré que cette supposition était fondée. Les ganglions du cou, la rate, le thymus, les testicules ont été prélevés chez des animaux dont la température centrale était de  $+15^{\circ}$  depuis des délais variables (de trois à sept heures). Examen histologique des coupes : lésions faibles au bout de trois heures, lésions déjà très importantes (nécrose et pycnose cellulaires) au bout de sept heures, tant dans le tissu lymphoïde que dans les organes génitaux. Nous retrouvons ici, point par point, les faits mentionnés à propos de nos recherches sur les endotoxines bactériennes. Nous n'avions pas craint alors de souligner — fait nouveau — le retentissement grave d'une circulation sanguine altérée sur la vie de certains tissus. Ce fait, depuis lors, a été admis par d'autres auteurs [6]. Les observations rapportées dans cette note parlent assurément dans le même sens.

On sait l'intérêt que l'on accorde, présentement, aux thérapeutiques par l'hibernation. Qu'elles puissent être, dans certains cas, utilisées avec fruit, nous le croyons bien volontiers. Néanmoins, compte tenu des résultats que nous venons d'exposer, nous pensons qu'elles peuvent entraîner aussi par elles-mêmes des complications sérieuses. Un refroidissement profond, nous l'avons montré, conduit à une inhibition de la diapédèse. En l'absence de leucocytes, qui pourra s'opposer à la dissémination des germes infectants (1) ? Par ailleurs, en admettant même que les lésions lymphocytaires et testiculaires provoquées par l'hibernation ne sont que transitoires — ce qui nous paraît être le cas — peut-on affirmer qu'elles sont négligeables ?

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. GIAJA, *La Presse Médicale*, 1953, **61**, 128.
- [2] J. GIAJA, *Biol. méd.*, 1953, **42**, 545.

(1) Précisons ici que, d'après nos observations personnelles, la diapédèse se rétablit chez le rat refroidi dès que celui-ci a retrouvé une température rectale normale.

- [3] Voir référence 2 et aussi J. MALMEJAC et E. DESANTI. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, 135, 1465.  
[4] A. DELAUNAY, J. LEBRUN et H. COTEREAU. *Ces Annales*, 1947, 73, 565.  
[5] A. DELAUNAY, J. LEBRUN, M. DELAUNAY et E. FOUCQUIER. *Ces Annales*, 1949, 76, 314. — A. DELAUNAY et G. VOISIN. *C. R. Ac. Sci.*, 1952, 234, 158.  
[6] Voir en particulier Gl. H. ALGIRE. *J. nat. Cancer Inst.*, 1951, 42, 1279.

## L'OVOCULTURE APPLIQUÉE A L'ISOLEMENT DES LEPTOSPIRES DANS LA LEPTOSPIROSE BOVINE

par G. CORDIER et B. HAROUNI.

(Laboratoire de l'Institut Arloing, Tunis.)

L'un des principaux objectifs à atteindre, en matière de recherches sur la leptospirose bovine en Tunisie a été, tout d'abord, l'isolement et l'entretien de souches.

L'obtention d'une souche de leptospires à partir du sang d'un bovin malade saigné dans la première décade de sa leptospirose, ne semble pas impossible *a priori*, surtout si l'on dispose de milieux sélectifs au sérum de lapins : milieux de Reiter et Ramme, de Stuart, de Korthof, etc. ; cependant, le sang des bovidés en crise récente ne nous a pas permis jusqu'ici d'assurer une culture.

L'urine qui est infiniment plus parasitée que le sang et dans laquelle les leptospires sont présents durant de longues périodes de temps pendant et après la convalescence, constituerait un excellent matériel de départ si l'existence concomitante de germes secondaires, notamment de colibacilles, ne représentait un obstacle sérieux quand il s'agit d'obtenir directement des cultures de spirochètes.

Le moyen habituellement exploité dans ce but est celui qui consiste à inoculer le produit pathogène aux petits animaux sensibles et à procéder à des hémocultures en milieu approprié, dès l'apparition d'un clocher thermique et pendant les jours qui suivent.

Les résultats obtenus d'après cette méthode seront rapportés dans une autre note. Dans celle-ci, il sera seulement fait mention des essais d'ovoculture auxquels ont donné lieu les études sur les leptospires bovines dans le cadre de notre laboratoire.

A la vérité, la formule n'est pas nouvelle et l'on doit à Stefanopoulo et Chevé [1] d'avoir repris avec le même succès les essais de culture en tissus embryonnaires de poulet déjà réalisés en 1938 par G. Morrow, W. W. Stiles et G. P. Berry.

Toutefois, tandis que ces différents auteurs faisaient appel au départ à des leptospires de culture, nos tentatives étaient basées sur l'utilisation directe d'urines reconnues parasitées après examen au fond noir.

*Protocole.* — L'urine récoltée si possible par cathétérisme, est centrifugée pendant une vingtaine de minutes à 3 000 tours, puis le culot,

après élimination du liquide surnageant, est remis en suspension de façon que 60 cm<sup>3</sup> d'urine correspondent sensiblement à 1 cm<sup>3</sup> de liquide, quantité utilisée pour ensemercer 5 embryons de onze à douze jours, sur la membrane chorio-allantoïde.

Après avoir recherché le meilleur des deux procédés d'inoculation,

TABLEAU I. — **Résultat des examens microscopiques de liquides organiques des embryons et des ensemencements auxquels ils ont donné lieu :**

*Première souche: Vache P. (abattoirs).*

Matériel utilisé : *a*, culot urine récoltée depuis 2 heures ; *b*, 10 embryons de 10 jours dont 5 ensemencés dans la cavité amniotique (lot 1), 5 ensemencés sur la C.A. (lot 2).

NUMÉROS	DURÉE de l'évolution en jours	RÉSULTAT de l'examen au fond noir	MATÉRIEL ensemencé sur Korthof.	RÉSULTAT des ensemencements
<i>Lot 1.</i>				
1 . . . . .	2	Liq. A. Al. +.	Liq. A. Al.	Pas de cult.
2 . . . . .	4	Liq. A. Al. +.	Liq. A. Al.	Pas de cult.
3 . . . . .	4	Liq. A. Al. 0.	Liq. A. Al.	Pas de cult.
4 . . . . .	4	Liq. A. Al. 0.	Liq. A. Al.	Pas de cult.
5 . . . . .	4	Liq. A. Al. 0.	Liq. A. Al.	Pas de cult.
<i>Lot 2.</i>				
1 . . . . .	2	Liq. A. Al. 0.	Liq. A. Al.	0
2 . . . . .	3	Liq. A. Al. 0.	Liq. A. Al.	0
3 . . . . .	3	Liq. A. Al. +.	Liq. A. Al.	0
		C. A. +.	C. A. = ( <i>a</i> )	++
4 . . . . .	3	Liq. A. Al. 0.	Liq. A. Al.	0
5 . . . . .	3	Liq. A. Al. +.	Liq. A. Al.	++
La membrane C. A. ( <i>a</i> ) de l'embryon 3 du lot 2 broyée, est utilisée pour effectuer un passage sur 2 embryons de 10-11 jours avec les résultats suivants :				
Embryon a <sub>1</sub> après 4 jours : liq. A. Al. au fond noir ++ ; ens. sur milieu Reiter +++ après 15 jours. Foie (fond noir) 0.				
Embryon a <sub>2</sub> après 4 jours : liq. A. Al. au fond noir +++ ; ens. sur milieu Reiter +++ après 15 jours.				

liquide amniotique ou chorio-allantoïde, la préférence est allée au second.

Il nous est apparu nécessaire d'ensemencer, avec le même matériel, un nombre assez important d'œufs (8 à 10), pour les raisons suivantes :

1° Les germes qui fréquemment sont associés aux leptospires, tuent ou polluent plus de 40 à 50 p. 100 des embryons, parfois la totalité, dans le cas de certains types de colibacilles ;

2° Il y a intérêt à échelonner l'ouverture des œufs, déjà inoculés, afin de multiplier les chances d'obtention des souches.



TABLEAU II. — La culture  $a^2$  est utilisée âgée d'un mois, pour inoculer 5 embryons de 11 jours, à raison de 0,05 cm<sup>3</sup> par œuf, ce qui donne :

Embryon $a_1^2$ après 48 heures, était mort peu après l'ensemencement		Les examens sont négatifs en ce qui concerne le liquide A Al	
Embryon $a_2^2$ après 4 jours vivant.	{ Liq. A. Al [FN] (4). . .	+ +	Ensemencement sur milieu K. . . + + +
	{ C. A. [FN] . . . . .	0	Ensemencement sur milieu K. . . + + +
Embryon $a_3^2$ après 5 jours vivant.	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	0	Ensemencement sur milieu S. . . + + +
	{ Sang cœur [FN] . . . .	0	Ensemencement sur milieu S. . . + +
Embryon $a_4^2$ après 6 jours vivant.	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	+	Ensemencement sur milieu K. . . + + +
	{ Sang cœur [FN] . . . .	0	Ensemencement sur milieu K. . . + + + +
	{ Foie [FN] . . . . .	0	Ensemencement sur milieu K. . . 0
Embryon $a_5^2$ après 6 jours vivant.	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	+ + +	Ensemencement sur milieu K. . . + +
	{ C. A. [FN] . . . . .	0	Ensemencement sur milieu K. . . + + +
	{ Sang cœur [FN] . . . .	0	Ensemencement sur milieu K. . . + + + +

(1) FN, fond noir.

TABLEAU III. — Résultats des examens microscopiques des liquides et pulpes organiques embryonnaires et des ensemencements auxquels ils ont donné lieu :

Matériel utilisé : a, culot urine récoltée depuis quatre heures ; b, 4 embryons de 11 à 12 jours ensemencés sur la C. A.		<i>Deuxième souche</i> : Vache C... (Réjà).	
Embryon 1 après 3 jours (vivant)	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . 0
	{ Sang cœur [FN] . . . .	{ Sang cœur [FN] . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . 0
Embryon 2 après 3 jours (vivant)	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . 0
	{ Sang cœur [FN] . . . .	{ Sang cœur [FN] . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . + +
	{ Foie [FN] . . . . .	{ Foie [FN] . . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . 0
Embryon 3 après 4 jours (vivant)	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . +
	{ Sang cœur [FN] . . . .	{ Sang cœur [FN] . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . 0
Embryon 4 après 7 jours (faiblement vivant).	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	{ Liq. A. Al [FN] . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . + +
	{ Sang cœur [FN] . . . .	{ Sang cœur [FN] . . . .	Ensemencé sur milieu S. . . . + + +

L'hémo-culture de 6 jours en milieu Stuart de l'embryon 4 est à nouveau utilisée pour ensementer 4 autres embryons de 44 jours qui permettront les observations suivantes :

Embryon 1 après 4 jours ; liq. A. Al [FN] 0 ; embryon 2 après 4 jours ; liq. A. Al [FN] + + + .  
 Embryon 3 après 5 jours ; liq. A. Al [FN] + + + ; embryon 4 après 5 jours ; liq. A. Al [FN] 0.



Les embryons retirés encore vivants sont placés dans des boîtes de Petri stériles après que l'on a eu soin de prélever aseptiquement une certaine quantité de liquide amniotique ainsi que la membrane C. A. Tandis que le sang du cœur est ensemencé aussitôt sur les milieux spécifiques, les liquides amnio-allantoïdiens, la membrane de même que le foie sont préalablement soumis à un examen au fond noir qui décide de leur utilisation en vue de cultures. Seuls sont retenus, à cet effet, les prélèvements non souillés, que soit décelée ou non la présence de leptospires.

Si le premier passage sur œuf est parfois délicat, dans la suite il s'avère que les embryons des séries successives s'adaptent mieux et il devient alors aisé d'obtenir en cinq ou six jours de riches cultures sur milieux Stuart, d'un troisième repiquage.

A titre d'exemple nous rapportons deux essais choisis entre sept qui ont été conduits selon le protocole décrit plus haut.

CONCLUSIONS. — L'ovoculture peut constituer un procédé d'isolement des leptospires, dans le cas de la leptospirose bovine, avec l'urine des malades comme matériel d'ensemencement.

Le pourcentage des embryons aptes à permettre une culture est assez variable (4 sur 10 dans un essai ; 3 sur 4 dans l'autre).

Les passages en série favorisent et accélèrent le développement des leptospires.

Il n'a pas été possible de fixer une date plus particulièrement favorable à l'ouverture des œufs en vue d'une meilleure récolte, car celle-ci a pu être assurée indifféremment deux, trois, quatre, cinq, six et même sept jours après l'inoculation des embryons.

Le résultat négatif d'un examen au fond noir, en ce qui concerne le liquide amnio-allantoïdien et le sang du cœur, n'est pas suffisant pour conclure à l'absence de leptospire et ne doit pas empêcher l'ensemencement ultérieur de ces liquides sur les milieux spécifiques au sérum de lapin.

L'avantage de l'ovoculture réside dans le fait qu'avec un matériel de départ, tel que l'urine, souvent très souillée, l'on peut réussir l'isolement d'une souche, opération beaucoup moins certaine avec les autres procédés biologiques et les cultures directes d'urine.

En outre, l'ovoculture est une méthode élégante, peu coûteuse, qui doit trouver de plus en plus sa place dans les laboratoires de pathologie animale.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [4] G. J. STEFANOPOULO et J. CHEVE. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1941, 15.

## SUR UN MODE DE MULTIPLICATION DES *STREPTOMYCES*

par H. PÉNAU, M<sup>me</sup> M. PEYRÉ et H. VELU

(avec le concours technique de M<sup>me</sup> D. GÉRARD.)

(Laboratoires de Recherches Roussel-Sofrapen.)

Les *Streptomyces*, Actinomycétales saprophytes, placés entre les Eubactériales et les Champignons, présentent un mode de multiplication si fréquent en culture profonde, agitée ou soufflée, que nous croyons utile de le signaler, car nous n'en avons pas trouvé de description détaillée. Il n'est d'ailleurs pas particulier à la phase submergée ; on le retrouve avec la même fréquence et la même régularité dans les cultures qui se développent sur la partie non immergée de lames plongées dans un milieu nutritif riche ; il est alors possible d'en suivre l'évolution dans le temps par l'examen d'une série de lames en contraste de phase ou après coloration par les techniques utilisées pour l'étude cytologique des Eubactériales.

Nous avons tout particulièrement étudié l'évolution de *Streptomyces griseus*.

La spore donne naissance d'abord à un ou deux tubes germinatifs, puis à de fins rameaux mycéliens qui s'allongent, en formant parfois des spires, et s'enchevêtrent plus ou moins, sans jamais montrer d'anastomoses certaines.

Peu à peu ces filaments grossissent en même temps que le cytoplasme se densifie. La coloration à l'acide tannique-crystal violet montre la présence du cell-wall et de rares cloisons ; celle à l'HCl-Giemsa décèle l'existence de formations chromatiques, irrégulièrement dispersées, parfois en voie de multiplication, qu'on peut assimiler à des noyaux.

On voit ensuite, — en même temps qu'apparaissent des massues sur lesquelles nous aurons l'occasion de revenir, — un grand nombre de filaments mycéliens dont le diamètre augmente et qui se distinguent nettement des autres par leur opacité de plus en plus grande au contraste de phase. Les cloisons s'y multiplient et divisent ce mycélium en éléments inégaux qui vont se séparer, même sur lames, soit par scission au niveau des cloisons, soit par lyse de certains d'entre eux, pour donner de très nombreux fragments géants, trapus, irréguliers, en forme de bûches.

F. Carvajal [1] les a observés dans les fermenteurs, sans insister sur leur importance, bien qu'il leur ait vu donner naissance, comme aux spores, à des tubes germinatifs ; on les retrouve également sur les planches de Gottlieb et Legator [2]. D'autre part, Erikson [3] a décrit des formes rhizoïdes qu'il considère comme caractéristiques de la croissance sur milieux solides à l'amidon.

Nos observations nous permettent de les considérer comme caracté-

ristiques d'un mode de multiplication et dignes d'une description précise (1). Leurs extrémités, coupées nettement, sont fermées par le cell-wall. Ils portent fréquemment des bourgeons latéraux plus ou moins marqués qui se présentent comme les traces des branches coupées sur une bûche. Le cytoplasme montre une richesse particulière en granulations chromatiques, distribuées de façon irrégulière, qui ne sont pas sans analogie avec celles récemment mises en évidence sur les coupes ultra-minces de *B. cereus* grâce au microscope électronique [4] ; quelques-unes, grosses, centrales, peuvent être considérées comme des noyaux ; les autres très nombreuses, plus petites, de taille variable, semblent assimilables aux corps périphériques ; les plus grosses d'entre ces dernières se trouvent aux extrémités de la bûche ou accompagnent les bourgeons latéraux.

Après leur séparation, ces fragments en forme de bûche donnent naissance, au niveau des points chromatiques terminaux ou périphériques latéraux les plus gros, à des filaments mycéliens, extrêmement fins, qui s'allongent parfois avec une vigueur exceptionnelle et s'épaississent rapidement en même temps qu'y émigrent les noyaux.

Toute la culture semble alors prise d'une fièvre de multiplication par bouturage, qui donne en abondance un mycélium jeune, identique à celui issu des spores, parfois sans apparition d'un seul élément sporogène.

*En résumé.* — Il existe chez les *Streptomyces* un mode de reproduction très particulier, strictement végétatif, par bouturage, qui, en l'absence de conditions favorables à la sporulation, permet dans certaines conditions, une multiplication massive.

Le phénomène reste parfois pur en certains points des cultures aériennes sur lame où cette phase, uniquement végétative, ne se mélange pas à la phase sporogène, tandis qu'il est plus souvent mixte en culture submergée.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. CARVAJAL. *Mycologia*, 1947, **39**, 426.
- [2] D. GOTTLIEB et M. LEGATOR. *Mycologia*, 1953, **45**, 507.
- [3] D. ERIKSON. *Ann. Rev. Microb.*, 1949, **3**, 23.
- [4] G. B. CHAPMAN et J. HILLIER. *J. Bact.*, 1953, **66**, 362.

(1) Cette description sera reprise ultérieurement en détail avec les plus caractéristiques des illustrations qui accompagnent cette présentation, dues à M. R. Viennet.

## DÉTERMINATION DE LA TAILLE DE QUELQUES BACTÉRIOPHAGES PAR ULTRACENTRIFUGATION

par MARIE PAVLATOU et PIERRE SLIZEWICZ.

(*Institut Pasteur, Service des Bactériophages et Service des Virus.*)

L'ultracentrifugation est avec la microscopie électronique et l'ultrafiltration un des moyens classiques de détermination de la taille des très petites particules.

Le travail que nous présentons a pour but de préciser les dimensions de plusieurs bactériophages typhiques isolés par l'un de nous [41]. On sait que les plages de lyse que l'on obtient sur les milieux de culture solidifiés renseignent déjà sur ce point : les petits corpuscules donnent de grandes plages et les gros corpuscules de petites plages [2]. Mais cette règle n'est valable que pour des bactériophages agissant sur la même souche bactérienne et dans des conditions absolument identiques (milieu, densité de l'ensemencement, température). Elle comporte des exceptions. On connaît l'existence de mutants de phages qui présentent parfois des plages de tailles différentes, bien qu'ils gardent les mêmes dimensions corpusculaires. Les résultats que nous avons obtenus confirment ce fait.

*Principe de la méthode.* — Soumis à un champ centrifuge élevé, le liquide contenant les corpuscules bactériophages s'appauvrit. Cette diminution de la concentration permet une évaluation du diamètre des phages en utilisant la formule établie par Elford [3] :

$$d = 10^7 \times 7,94 \sqrt{\frac{\eta \log \frac{x+h}{x+h \frac{C_0}{C_t}}}{(\sigma_p - \sigma_m) N^2 t}}$$

où  $C_0$  représente la concentration initiale,  $C_t$  la concentration après un temps de centrifugation  $t$  exprimé en minutes,  $x$  la distance en centimètres du sommet du tube de centrifugation à l'axe de rotation,  $h$  la hauteur en centimètres du prélèvement dans le tube de centrifugation,  $\eta$  la viscosité du milieu en poises,  $N$  le nombre de tours par minute du rotor,  $\sigma_p$  la densité du corpuscule,  $\sigma_m$  la densité du milieu.

Cette formule est établie en supposant que la loi de Stokes est valable, en particulier que le corpuscule est sphérique. Elle suppose connue la densité du bactériophage que nous avons prise égale à 1,25. La densité du milieu est considérée comme égale à celle de l'eau à 20° C.

*Matériel et Techniques.* — Nous avons utilisé l'ultracentrifugeuse Henriot et Huguenard modifiée par P. Lépine [6] et utilisée par celui-ci et ses collaborateurs [7, 8, 9, 10] pour déterminer la taille de quelques virus et bactériophages. Dans nos expériences la hauteur du liquide

prélevé dans les tubes capillaires après la centrifugation est de 1,25 cm. La distance  $x$  est égale à 0,75 cm. Les tubes employés sont en aluminium et sont creusés de six cavités capillaires remplies du liquide à centrifuger. Pour éliminer les causes d'erreur que pourrait introduire l'emploi de ces tubes métalliques par adsorption des bactériophages, on remplit trois tubes identiques avec la solution étudiée. La détermination de la richesse en bactériophages dans ces tubes témoins donnera  $C_0$ . On prend toutes les précautions nécessaires pour éviter la destruction des bactériophages par action physique : lumière et chaleur. Les prélèvements sont effectués dans les moindres délais après la centrifugation. Pour chaque essai, on effectue trois titrages dont la moyenne nous donne la valeur de  $C_t$ . Le titrage des bactériophages a été réalisé par la méthode de numération des plages de lyse produites par une dilution convenable de la solution aux dépens de la bactérie sensible ensemencée sur milieu solide en boîtes de Petri. Les prélèvements dans les tubes capillaires sont dilués au 1 : 10, puis on détermine le titre de cette dilution.

*Vérification de la méthode.* — Afin de vérifier notre technique (1), nous avons déterminé par la méthode qui vient d'être décrite la taille du bactériophage  $C_{16}$  dont les dimensions sont bien connues :

Ultracentrifugation (Lépine [9]) . . . . .	57 $\pm$ 3 $\mu$
Ultrafiltration (W. J. Elford [4]) . . . . .	60 — 90 $\mu$
Irradiation (Holweck [5]) . . . . .	60 $\mu$

Nos résultats sont les suivants :

DURÉE (min)	VITESSE (t/min)	$C_t$	$C_0$	DIAMÈTRE	DIAMÈTRE moyen
15	35 400	2,52 $\cdot 10^8$	11,2 $\cdot 10^8$	62	65 $\pm$ 1,5
15	32 220	2,8 $\cdot 10^8$	11,2 $\cdot 10^8$	66,5	
20	31 500	2,8 $\cdot 10^8$	13,6 $\cdot 10^8$	62,5	
15	33 600	2,44 $\cdot 10^8$	13,6 $\cdot 10^8$	68	

Ces résultats sont donc en excellent accord avec ceux qui ont été déjà publiés. Une autre vérification de la fidélité de la méthode a été réalisée au cours de nos expériences. En effet le phage 5 était un mutant du phage 3 régénéré sur une souche différente. On sait que les dimensions corpusculaires d'un bactériophage comme ses propriétés antigéniques, sont des caractères stables, qui jusqu'à présent du moins, ne paraissent pas affectés par les mutations. Les régénérations des phages sur deux souches différentes peuvent faire varier leur gamme d'activité, la morphologie des plages et quelques autres caractères comme leurs exigences biochimiques, mais elles ne sauraient changer la morphologie des corpuscules ni leurs propriétés sérologiques (Delbrück [4]). Le phage 3 donne des plages de dimension 0,25 cm

(1) Ces expériences de contrôle nous ont montré la nécessité de connaître aussi exactement que possible la température au cours de la centrifugation : 20° dans notre travail.



environ, tandis que le phage 5 donne des plages de dimension 1-1,25 cm. Par l'ultracentrifugation on a trouvé la même taille pour ces deux phages.

*Résultats expérimentaux.* — Pour chaque bactériophage étudié, nous avons effectué quatre déterminations indépendantes en faisant varier soit la durée de la centrifugation (2), soit la vitesse. On prend la moyenne arithmétique  $d_m$  de ces quatre déterminations et l'on calcule l'écart quadratique moyen  $\varepsilon$  (3).

Bactériophage	Centrifugation		$C_o$	$C_t$	Diamètre ( $\mu$ )	Diamètre moyen ( $\mu$ )
	Durée (mn)	Vitesse (t/mn)				
1	20	31.500	$6,8 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$	51,5	$39,5 \pm 4$
	15	31.500	$6,8 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^6$	34,5	
	15	31.500	$9,2 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^6$	35,5	
	10	31.500	$9,2 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^6$	36	
2	15	32.400	$2,8 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^6$	73	$74 \pm 4$
	10	32.400	$2,8 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^6$	85	
	15	38.400	$9,2 \cdot 10^7$	$1,04 \cdot 10^7$	62,5	
	10	37.800	$9,2 \cdot 10^7$	$1,28 \cdot 10^7$	76,5	
3	20	31.200	$1,2 \cdot 10^8$	$5,6 \cdot 10^7$	47,5	$43 \pm 3$
	15	30.900	$8,8 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	41,5	
	10	31.200	$1,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	35,5	
	10	36.000	$8,8 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^7$	47,5	
4	20	30.600	$1,04 \cdot 10^7$	$1,88 \cdot 10^6$	60	$66 \pm 3$
	10	30.600	$1,04 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^6$	76	
	15	31.200	$1,04 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^6$	67	
	10	36.600	$1,00 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^6$	67	
5	15	32.400	$1,44 \cdot 10^9$	$1,04 \cdot 10^9$	44,5	$42 \pm 3$
	10	32.100	$1,44 \cdot 10^9$	$1,20 \cdot 10^9$	31,5	
	20	28.800	$6,40 \cdot 10^8$	$3,60 \cdot 10^9$	46	
	15	27.600	$6,40 \cdot 10^8$	$4,40 \cdot 10^9$	45	
6	20	33.000	$6,4 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^6$	40	$40 \pm 3$
	15	31.200	$6,4 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^6$	31	
	10	31.200	$8,0 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	43	
	10	36.600	$8,0 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	48,5	
7	20	31.200	$2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	39	$33,5 \pm 4$
	15	32.500	$2 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	22,5	
	15	30.600	$2 \cdot 10^8$	$1,38 \cdot 10^8$	41	
	10	36.600	$2 \cdot 10^8$	$1,64 \cdot 10^8$	31,5	

(2) Dans la mesure de la durée de la centrifugation on ne tient compte ni du temps d'accélération, ni du temps de freinage.

$$(3) \quad \sigma^2 = \frac{(d_m - d_1)^2 + (d_m - d_2)^2 + \dots + (d_m - d_n)^2}{n - 1}$$

et  $\varepsilon = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$   $n$  étant le nombre de déterminations.

*Conclusion.* — Malgré les réserves que l'on peut faire sur la détermination de la taille des bactériophages par l'emploi des données de l'ultracentrifugation dans la formule d'Elford, la méthode employée donne des résultats cohérents, fidèles, reproductibles, et en bon accord avec ceux donnés par d'autres méthodes.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. DELBRÜCK, *Unités biologiques douées de continuité génétique*, Paris, Centre National de la Recherche Scientifique, 1949.
- [2] W. J. ELFORD et C. H. ANDREWES. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 446.
- [3] W. J. ELFORD. *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 399.
- [4] W. J. ELFORD, in R. DOERR et C. HALLAUER. *Handbuch der Virusforschung*, Vienne, Springer Verlag, 1938, **1**, 179.
- [5] E. HOLWECK, S. LURIA et E. WOLLMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **210**, 639.
- [6] P. LÉPINE. *J. Chim. Phys.*, 1942, **39**, 1.
- [7] P. LÉPINE, J.-C. LEVADITI et J. GIUNTINI. *Ces Annales*, 1941, **67**, 477.
- [8] P. LÉPINE, J. GIUNTINI et J.-C. LEVADITI. *Ces Annales*, 1941, **67**, 480.
- [9] P. LÉPINE, P. NICOLLE et J. GIUNTINI. *Ces Annales*, 1942, **68**, 503.
- [10] P. LÉPINE, J.-C. LEVADITI, P. GRABAR et J. GIUNTINI. *Ces Annales*, 1943, **69**, 238.
- [14] P. NICOLLE, M. PAVLATOU et G. DIVERNEAU. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 2453.

## ACTION DE DIVERS ANTISEPTIQUES SUR LE VIRUS DU FIBROME DE SHOPE

par G. PONTIERI et L. CHAUMONT.

(*Institut Pasteur, Service des Virus.*)

Le but des expériences était d'étudier la résistance comparée des souches OA et Boerlage du virus du fibrome de Shope vis-à-vis de divers antiseptiques. Le titrage de la virulence des souches était réalisé sur la peau du lapin. Les antiseptiques essayés ont été : l'alcool, l'éther, l'oxyde d'éthylène, l'acide trichloracétique (1) et le crésyl G. C. G. B. (2).

*Technique.* — Une tumeur au stade de son plein développement sur le lapin est extirpée et broyée au mortier avec du sable de quartz. Après addition de 9 vol. d'eau distillée on centrifuge pendant cinq minutes à 2 500 t/m. C'est le surnageant qui servira de source de virus et il sera utilisé aux trois dilutions de  $1.10^{-2}$ ,  $5.10^{-2}$  et  $1.10^{-3}$ . Sur ces trois dilutions on essaie l'action de diverses concentrations des antiseptiques choisis. Le temps de contact entre antiseptique et

(1) Acide trichloracétique des Etablissements Roche.

(2) Formule standard n° 368 de la Compagnie Générale des Goudrons et Bitumes.

suspension de virus est dans tous les cas de une heure à 0°. Puis on inocule 0,5 cm<sup>3</sup> de chacun des échantillons, par voie intradermique, sur le flanc rasé du lapin. Chaque expérience est réalisée sur deux lapins et les résultats sont lus dix jours après l'injection. Les volumes inoculés ont été de 0,50 cm<sup>3</sup>, quelle que soit la concentration du virus.

RÉSULTATS. — 1° *Titration*. — La souche Boerlage se révèle infectieuse jusqu'à la dilution de 1.10<sup>-6</sup>, la souche OA jusqu'à la dilution de 1.10<sup>-5</sup>.

2° *Action de l'alcool*. — La souche Boerlage est plus résistante à l'alcool que la souche OA, la première étant inactivée par des concentrations de 30 p. 100 d'alcool, la seconde, par des concentrations de 20 p. 100 seulement (tableau 1).

3° *Action de l'éther*. — La souche Boerlage, à la dilution de 1.10<sup>-2</sup>, traitée par l'éther à la concentration de 60 p. 100, donne encore des

Tableau 1 ALCOOL A 90°	Souche	Dilution du virus	Concentration du produit utilisé																
			1%	2%	0.5%	1%	2%	4%	5%	8%	10%	15%	20%	25%	30%	40%	50%	60%	70%
	OA	1:100					+++	+++		++	++		+		0	0			
		1:500					+++	+++		++	++				0	0			
		1:1000					+++	+++		++	++		+		0	0			
	Boerlage	1:100									++	++	++	+	+	0			
		1:500									++	++	+	+	+	0			
		1:1000									++	++	+	+	+	0			
Tableau 2 ETHER	OA	1:100									+++		++		++	++	0	0	0
		1:500									+++		++		++	0	0	0	0
		1:1000									0		0		0	0	0	0	0
	Boerlage	1:100									+++		++		++	++	++	+	0
		1:500									++		++		++	++	++	0	0
		1:1000									++		++		++	+	+	0	0
Tableau 3 OXYDE D'ETHYLENE	OA	1:100	+++	++	++	+	0		0		0								
		1:500	++	++	++	+	0		0		0								
		1:1000	++	+	+	+	0		0		0								
	Boerlage	1:100	+++	++	++	+	0		0		0								
		1:500	+++	++	++	+	0		0		0								
		1:1000	++	+	+	+	0		0		0								
Tableau 4 CRESYL	OA	1:100	+++	+++		++									0		0		
		1:500	+++	++		++					0		0		0		0		
		1:1000	+++	++		++					0		0		0		0		
	Boerlage	1:100	+++	++		++					++		++		0		0		
		1:500	+++	++		++					++		+		0		0		
		1:1000	+++	++		++					++		+		0		0		
Tableau 5 A.T.S.	OA	1:100	+++	++		++	0		0		0								
		1:500	+++	++		++	0		0		0								
		1:1000	+++	++		±	0		0		0								
	Boerlage	1:100	++	++		+	±		0		0								
		1:500	++	++		+	±		0		0								
		1:1000	++	++		+	±		0		0								

\* Diamètre de la tumeur:

+++ = 11-15 mm ; ++ = 6-10 mm ; + = 1-5 mm ; ± = traces.



tumeurs chez le lapin ; aux dilutions de  $2.10^{-3}$  et  $1.10^{-3}$ , elle reste virulente avec des concentrations d'éther de 50 p. 100. La souche OA ne résiste pas à des concentrations d'éther de 50 p. 100 (tableau 2).

4° *Action de l'oxyde d'éthylène.* — La souche Boerlage et la souche OA sont toutes les deux inactivées par des concentrations de ce produit de 2 p. 100 (tableau 3).

5° *Action du crésyl.* — La souche Boerlage est inactivée par des concentrations de crésyl de 5 p. 100. La souche OA, par des concentrations de 2 p. 100 (tableau 4).

6° *Action de l'A.T.S.* — La souche Boerlage est inactivée par des concentrations de 30 p. 100 d'A.T.S. La souche OA aux dilutions de  $5.10^{-2}$  et  $1.10^{-3}$ , est inactivée par des concentration de 10 p. 100 ; à la dilution de  $1.10^{-2}$ , elle ne supporte pas des concentrations de 30 p. 100 (tableau 5).

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales* de l'Institut Pasteur :

**Les bacilles de Koch incomplètement évolués dans la bacillémie au cours de la tuberculose expérimentale du cobaye et du lapin**, par L. NÈGRE et J. BRETEY.

**Utilisation des hémagglutinines pour l'identification de l'origine spécifique des hématies ingérées par les moustiques hématophages**, par A. GRJEBINE, A. EYQUEM et J. FINE.

**Préparation d'un silico-gel stérile, ensemençable en surface et en profondeur**, par J. AUGIER.

**Sur un cas tunisien mortel de mycose généralisée**, par C. VERMEIL, A. GORDEEFF et N. HADDAD.

**Contribution à l'étude de la toxine cholérique : variation du pouvoir toxique de *Vibrio cholerae***, par J. GALLUT.

**Sur la détermination des *Candida*. Etude des caractères morphologiques et physiologiques de 78 souches isolées de prélèvements pathologiques**, par E. DROUHET et M<sup>lle</sup> M. COUTEAU.

**Le virus « cobaye pulmonaire », agent d'une pneumopathie spontanée du cobaye. Son incidence en pathologie humaine**, par A. PELLISSIER.

## LIVRES REÇUS

*L'hôpital psychiatrique public. Troisième rapport du Comité d'Experts de la Santé mentale (OMS). Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 73, 40 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 1, sh. 2, \$ 0,25. Dépositaire, Masson et C<sup>ie</sup>, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.*

Dans ce rapport, les experts attachent beaucoup d'importance à l'ambiance de l'hôpital mental, qui contribue à la réussite du traitement. Le rôle de l'hôpital psychiatrique est celui « d'une communauté thérapeutique ». Parmi les éléments importants qui contribuent à créer un bon climat psychologique, on compte le respect de la personnalité du malade, le fait de le considérer *a priori* comme digne de confiance et capable de prendre des responsabilités et des initiatives, enfin, le fait d'encourager un bon comportement social. Il est souhaitable que l'hôpital soit composé d'un groupe de petits bâtiments, répartis dans des sites naturels entourés de terrains boisés, de jardins et de champs cultivés. Le rapport traite brièvement des soins à domicile, des établissements pour vieillards, des hôpitaux spécialisés et des services psychiatriques dans les hôpitaux généraux. Les activités et traitements extra-hospitaliers sont également envisagés. Au nombre des activités suggérées figurent la diffusion d'informations relatives à la santé mentale, l'éducation en hygiène mentale, l'étude des problèmes de santé mentale. Les experts recommandent vivement que les médecins de la collectivité entretiennent des relations suivies avec le personnel psychiatrique de l'hôpital. Ces activités conduiront bientôt à l'établissement d'un service externe de consultations et traitements psychiatriques, dont le rôle et l'organisation sont décrits dans le rapport.

H. T.

*Vaccination antidiphtérique et anticoquelucheuse. Rapport d'une conférence des chefs de laboratoires préparant des vaccins antidiphtériques et anticoquelucheux. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 61, 96 p. Prix : Fr. fr. 175, Fr. s. 2,20, 4 sh. 3 d., \$ 0,55. Dépositaire, Masson et C<sup>ie</sup>, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.*

Une conférence s'est tenue en Yougoslavie en octobre 1952 sous les auspices de l'OMS ; quinze experts venus de douze pays différents ont étudié la préparation et l'utilisation des agents prophylactiques dans la lutte contre la diphtérie et la coqueluche. Pour être efficace, la vaccination antidiphtérique exige l'emploi de produits véritablement actifs. En conséquence, le rapport s'étend longuement sur la préparation des anatoxines diphtériques et sur la mesure de leur activité en fonction de l'étalon biologique approprié ; il donne aussi des indications sur l'efficacité respective des différentes anatoxines et sur le rôle de chacune d'elles dans la lutte contre la diphtérie.

Du point de vue de la préparation et du contrôle biologique, les



progrès ont été plus rapides pour les anatoxines diphtériques que pour les vaccins anticoquelucheux. On ne connaît pas encore de méthode permettant d'obtenir des résultats constants dans la préparation du vaccin anticoquelucheux, mais le rapport résume l'état actuel des connaissances et expose, sur la base des essais d'application, quelles sont les méthodes qui se révèlent satisfaisantes et celles qu'il convient d'éviter.

Quant aux vaccins mixtes antidiphtériques-anticoquelucheux (dont certains sont associés à l'anatoxine tétanique), qui sont utilisés de plus en plus depuis quelques années, un certain nombre de problèmes d'ordre scientifique ou pratique devra être résolu avant qu'il soit possible d'en recommander l'emploi. Le rapport contient également des détails techniques sur la préparation des vaccins.

H. T.

**Z. Z. Godlowski.** — *Enzymatic concept of anaphylaxis and allergy and the role of eosinophils in anaphylactic reactions related to hormonal alterations.* 1 vol., 120 p., E. et S. Livingstone, édit., Londres 1953. Prix : 15 shillings.

L'auteur expose ses travaux sur la question et la théorie qu'il en a déduite en ce qui concerne le mécanisme de l'allergie. Un des éléments principaux de cette théorie est constitué par le rôle capital que joueraient les éosinophiles, dont la formation et la fonction sont interprétées d'une façon personnelle par l'auteur.

H. T.

**L. J. Davis et A. Brown.** — *The megaloblastic anaemias.* 1 vol., 113 p., 12 fig., 4 pl. hors texte, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1953. Prix : 21 shillings.

Les auteurs s'adressent, non pas à l'hématologiste, mais au médecin praticien ; leur livre traite donc des aspects cliniques de la question et n'envisage que très brièvement les diverses théories qui essaient d'expliquer la formation des mégalo-blastes et l'érythropoïèse en général. Après avoir rappelé que le diagnostic des anémies mégalo-blastiques repose maintenant essentiellement sur la ponction sternale, ils étudient les différents types de ces anémies : anémies de la maladie d'Addison, anémies dues à un mauvais fonctionnement de l'intestin ou de l'estomac, à une nutrition défectueuse, à des parasites, anémies de la grossesse, de l'enfance, etc. Un chapitre spécial est consacré à la question de l'étiologie, et en particulier, au rôle de la vitamine B<sub>12</sub> et de l'acide folique. Les divers mécanismes qui peuvent entrer en jeu sont discutés et on décrit brièvement les expériences qui ont permis de les étudier chez l'animal. Bien des points restent encore obscurs et il faut espérer que de nouvelles recherches permettront de serrer la question de plus près et de se rapprocher de la solution.

H. T.

*Le Gérant : G. MASSON.*